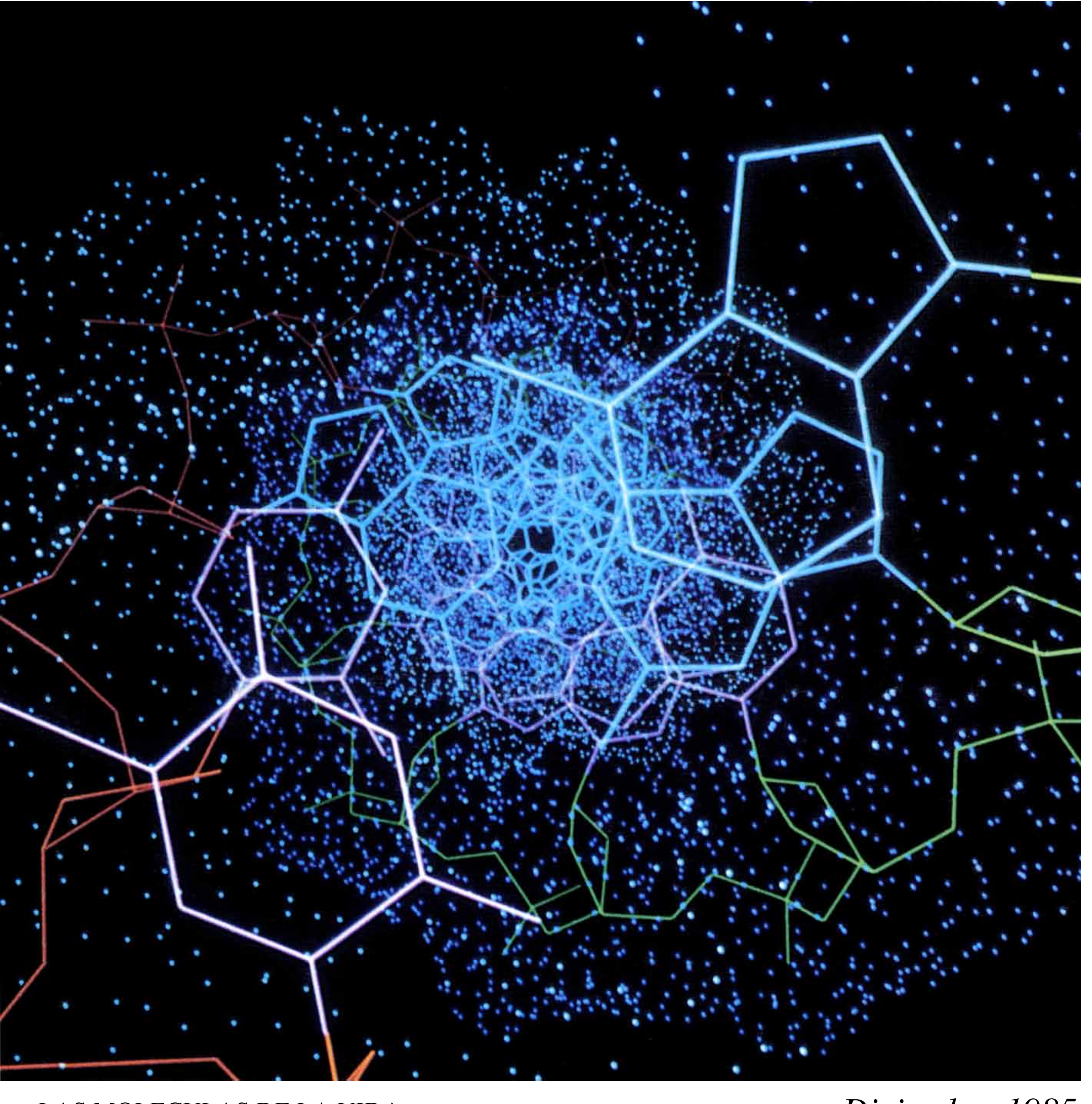
INVESTIGACION Y CIENCIA

Edición en español de **SCIENTIFIC AMERICAN**



LAS MOLECULAS DE LA VIDA

Diciembre 1985
500 PTAS.

Los espacios en gris
corresponden a publicidad
en la edición impresa

Número 111
Diciembre 1985

INVESTIGACION Y CIENCIA *Edición en español de* SCIENTIFIC AMERICAN

EDITA Prensa Científica, S.A.
Calabria, 235-239
08029 Barcelona (ESPAÑA)

Colaboradores de este número:

Asesoramiento y traducción:

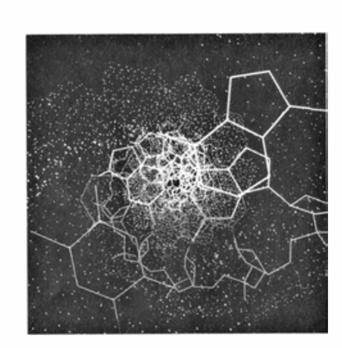
Pilar López Laseras: *Moléculas de la vida*; Lluís Cornudella: *ADN*; Santiago Torres Martínez: *ARN*; Eduardo Cadenas y Quira Cadenas: *Proteínas*; Juan Carmelo Gómez Fernández: *Moléculas de la membrana celular*; Ramón Fontarnau y F. E. Lynd: *Moléculas de la matriz celular*; Isabel García Acha y Julio Rodríguez Villanueva: *Moléculas del sistema inmunitario*; Esteban Santiago Calvo: *Base molecular de la comunicación intercelular*; María Amelia Sánchez Pina y Adela Olmedilla Arnal: *Base celular de la comunicación intracelular*; Rosa María Aguilar y Juan Modolell Mainou: *Base molecular del desarrollo*; Eduardo García Peregrín y Juan A. Aguilera Mochón: *Base molecular de la evolución*; Luis Bou: *Juegos de ordenador*; J. Vilardell: *Taller y laboratorio.*

Ciencia y sociedad:

Gregorio Gil Pujades y Antonio Argandoña

Libros:

Ramón Margalef y Luis Alonso.



PORTADA

La portada muestra un vista frontal de la doble hélice de ADN, la molécula que contiene la información genética, convertida hoy en el símbolo de la biología molecular. La imagen generada por computador ofrece una visión gran angular a lo largo del eje de la forma *B* de la doble hélice. Los grupos azúcar y fosfato que constituyen el armazón de una de las dos cadenas de la molécula se han representado en rojo; en verde, los elementos de la otra cadena. Ambas hebras se hallan unidas mediante pares de bases: una purina (*azul*) en una cadena se aparea con una pirimidina (*rosa*) en la otra. La nube en espiral de puntos representa la superficie accesible, es decir, la superficie más externa de la molécula de ADN, con la que interactúan otras moléculas. La imagen fue obtenida por Arthur J. Olson, adscrito al Instituto de Investigación de la Clínica Scripps.

Suscripciones:

Prensa Científica, S. A.
Calabria, 235-239
08029 Barcelona (España)
Teléfono 322 05 51 ext. 33-37

Condiciones de suscripción:

España:
Un año (12 números); 4400 pesetas

Extranjero:
Un año (12 números): 33 U.S. $

Ejemplar atrasado ordinario:
400 pesetas

Ejemplar atrasado extraordinario:
500 pesetas

Distribución para España:

Distribuciones de Enlace, S. A.
Bruch, 49 - 08009 Barcelona

Distribución para los restantes países:

Editorial Labor, S. A.
Calabria, 235-239 - 08029 Barcelona

Publicidad:

Madrid:
Gustavo Martínez Ovin
Avda. de Moratalaz, 137 - 28030 Madrid
Teléfonos 430 84 81 - 437 12 91

Cataluña:
Lourdes Padrós
Manuel Girona, 61, 2.° - 08034 Barcelona
Teléfono 204 45 83

Controlado
por O.J.D.



PROCEDENCIA DE LAS ILUSTRACIONES

Ilustración de la portada de Arthur J. Olson, © 1985

Página	Fuente
13-14	Robert Langridge
15	Nelson L. Max
16	Robert Langridge
17	Arthur J. Olson
18	Richard J. Feldmann
19-22	Ilil Arbel
25	Brian W. Matthews
26	George V. Kelvin
27	Richard J. Feldmann
28-32	George V. Kelvin
33	Gary Felsenfeld
37	Nigel Unwin
38-46	George V. Kelvin
42	Louise T. Chow
55	Jane M. Burridge
56-57	Hank Iken
58-59	Jane M. Burridge
60, 63	Hank Iken
61-62	Edward Bell
67	Guy Vigers
68-72	Dana Burns
73	M. M. Perry y A. B. Gilbert
74	Dana Burns
77	J. Victor Small y Gottfried Rinnerthaler
78	David Henderson
79	R. Bravo y J. E. Celis
80, 86	Klaus Weber y Mary Osborn

Página	Fuente
82, 85	Hank Iken, Walken Graphics
83	Hank Iken, Walken Graphics (*izquierda*); John Glenney (*arriba, derecha*), Timothy J. Byers y Daniel Branton (*abajo, derecha*)
84	Hank Iken, Walken Graphics (*izquierda*); John E. Heuser (*derecha*)
88	Klaus Weber y Mary Osborn (*arriba*); David Mason (*abajo*)
91	Arthur J. Olson
92	Gabor Kiss
93	Arthur J. Olson
94-98	Gabor Kiss
101	Tripos Associates
102-110	Alan D. Iselin
108	Tripos Associates (*arriba*)
110	Tripos Associates (*izquierda*)
113	Tripos Associates
114-122	Andrew Christie
124-125	Walter J. Gehring
126-128	Tom Prentiss
129-143	Walter J. Gehring
137	IBM U.K. Limited
138-144	Joan Starwood
146	Brian Bevan, Ardea London
149-152	Michael Goodman

ISSN 0210-136X
Dep. legal: B. 38.999-76

Fotocomposición Tecfa, S.A.
Pedro IV, 160 - 08005 Barcelona

Fotocromos reproducidos por GINSA, S.A.

Gráfica Elzeviriana, S.A.
Nápoles, 249 - Tel. 207 40 11
08013 Barcelona

Printed in Spain - Impreso en España

Los autores

ROBERT A. WEINBERG ("Moléculas de la vida") es catedrático de biología en el Centro de Investigación del Cáncer del Instituto de Tecnología de Massachusetts y miembro del Instituto Whitehead de Investigación Biomédica. Se formó en el MIT, donde se doctoró en 1969. Completó su preparación en el Instituto Weizmann de la Ciencia, con Ernest Winocur, y en el Instituto Salk de Estudios Biológicos, con Renato Dulbecco. Volvió al MIT en 1972; un año después ingresaba en el claustro docente del Centro de Investigación del Cáncer. En 1982 recibió su nombramiento para el cargo que actualmente ocupa.

GARY FELSENFELD ("ADN") dirige la sección de quimicofísica del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Artritis, Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales de los Estados Unidos. Licenciado en ciencias bioquímicas por el Harvard College (1951), estudió quimicofísica con Linus Pauling en el Instituto de Tecnología de California, por el que se doctoró en 1955. Al cabo de tres años de investigación en el Instituto Nacional de la Salud Mental ingresó en el claustro de la Universidad de Pittsburg, en calidad de profesor asistente de biosífica. En 1961 accedió a su cargo actual.

JAMES E. DARNELL, JR. ("ARN"), preside la cátedra Vincent Astor de la Universidad Rockefeller. Cursó el primer ciclo universitario en Mississippi y se licenció, por la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington, en 1955; continuó su formación en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto Nacional de la Salud. En 1961 se trasladó al Instituto de Tecnología de Massachusetts y, en 1964, a la Facultad de Medicina Albert Einstein de Nueva York. En 1968 se incorporó a la Universidad de Columbia y, tras seis años de estancia en ella, lo contrató la Universidad Rockefeller.

RUSSELL F. DOOLITTLE ("Proteínas") enseñó bioquímica en la Universidad de California en San Diego. Licenciado por el Trinity College en 1957, se doctoró por la Universidad de Harvard en 1962. En 1964 entró de investigador ayudante en San Diego; tres años después, fue nombrado profesor asistente. En 1982 accedió a la cátedra. Doolittle dice haber encontrado la raíz del interés que ha dirigido la actividad científica de toda su vida en un proyecto de verano acerca de la fisiología comparada de peces y humanos que realizó en sus tiempos de estudiante.

MARK S. BRETSCHER ("Moléculas de la membrana celular") dirige la división de biología celular del Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica de Cambridge (CIM). Se formó en la Universidad de Cambridge, por la que es doctor desde 1964. Tras un año como becario Fulbright en Stanford ingresó en la plantilla del CIM. En 1984 se le nombró jefe de su división de biología celular. El pasado julio concluyó Bretscher una estancia como profesor visitante de bioquímica en la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford.

KLAUS WEBER y MARY OSBORN ("Moléculas de la matriz celular"), marido y mujer, se dedican, en equipo, a la investigación de la matriz celular en el Instituto Max Planck de Química Biofísica de Göttingen. Weber, uno de los directores del Instituto, se doctoró en Alemania antes de entrar en la Universidad de Harvard, en 1967. De vuelta a Europa desempeñó el cargo de secretario general de la Organización Europea de Biología Molecular. Osborn es miembro del equipo científico del Instituto. Licenciada por Cambridge, se recibió de doctora en biofísica, en 1967, por la Universidad de Pennsylvania. En Harvard realizó trabajos de investigación postdoctorales con James D. Watson, retornando a su Inglaterra natal para trabajar durante tres años en el Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigación Médica de Cambridge. Tras contraer matrimonio en 1972, Weber y Osborn pasaron dos años en el Laboratorio Cold Spring Harbor, trasladándose seguidamente a Göttingen.

SUSUMU TONEGAWA ("Moléculas del sistema inmunitario") es profesor de biología del Centro de Investigación del Cáncer del Instituto de Tecnología de Massachusetts. Nació en Japón y cursó estudios universitarios en la Universidad de Kyoto. En 1963 se trasladó a los Estados Unidos para ampliar su formación doctorándose por la Universidad de California en San Diego, donde permaneció algunos años más, para ingresar luego en el Instituto de Inmunología de Basilea. En 1981 accedió a una cátedra del MIT.

SOLOMON H. SNYDER ("Base molecular de la comunicación intercelular") dirige el departamento de neurobiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins. Procede de la Universidad de Georgetown, donde, en 1962, acabó la carrera de medicina. En 1965 fue nombrado adjunto del departamento de psiquiatría del Hospital Johns Hopkins. Un año después era ya adjunto de farmacología y terapéutica experimental de la Universidad de Johns Hopkins. Accedió a la cátedra en 1970.

MICHAEL J. BERRIDGE ("Base molecular de la comunicación intracelular") es investigador científico y jefe superior de la Unidad de Neurofisiología y Farmacología de Insectos de la Universidad de Cambridge. Nació en Zimbabue. Se licenció por el Colegio Universitario de Rhodesia y Niasalandia en 1960. En 1965 se recibió de doctor por Cambridge. Se trasladó entonces a los Estados Unidos, permaneciendo un año en la Universidad de Virginia y tres en la de Case Western Reserve. Volvió a Cambridge en 1969.

WALTER J. GEHRING ("Base molecular del desarrollo") es catedrático y director del departamento de biología celular del Biocenter de la Universidad de Basilea. Nació en Zurich, en cuya universidad se educó, licenciándose en zoología en 1963 y doctorándose en 1965. Preparaba su tesis sobre la mosca *Drosophila* cuando se interesó por la genética molecular, que desde entonces ha constituido su campo de investigación. Tras cinco años de docencia en la Universidad de Yale volvió a Suiza. Gehring se unió al claustro docente del Biocenter poco después de su fundación, en 1971.

ALLAN C. WILSON ("Base molecular de la evolución") dicta cursos de bioquímica en la Universidad de California en Berkeley. En 1955 concluyó el primer ciclo de carrera en la Universidad de Otago, en su Nueva Zelanda natal. Prosiguió su formación en los Estados Unidos, licenciándose en ciencias por la Universidad estatal de Washington (1957); se doctoró por Berkeley en 1961. En 1964, después de tres años de investigación postdoctoral en la Universidad Brandeis volvió a Berkeley. Wilson ha trabajado también en el Instituto Weizmann, Universidad de Nairobi y Universidad de Harvard.

Hace...

José M.ª López Piñero

...trescientos cincuenta años

Apareció el primer libro científico de Miguel Servet, una edición latina comentada de la *Geografía* de Ptolomeo, titulada *Cl. Ptolomaei geographiae enarrationis libri octo*.

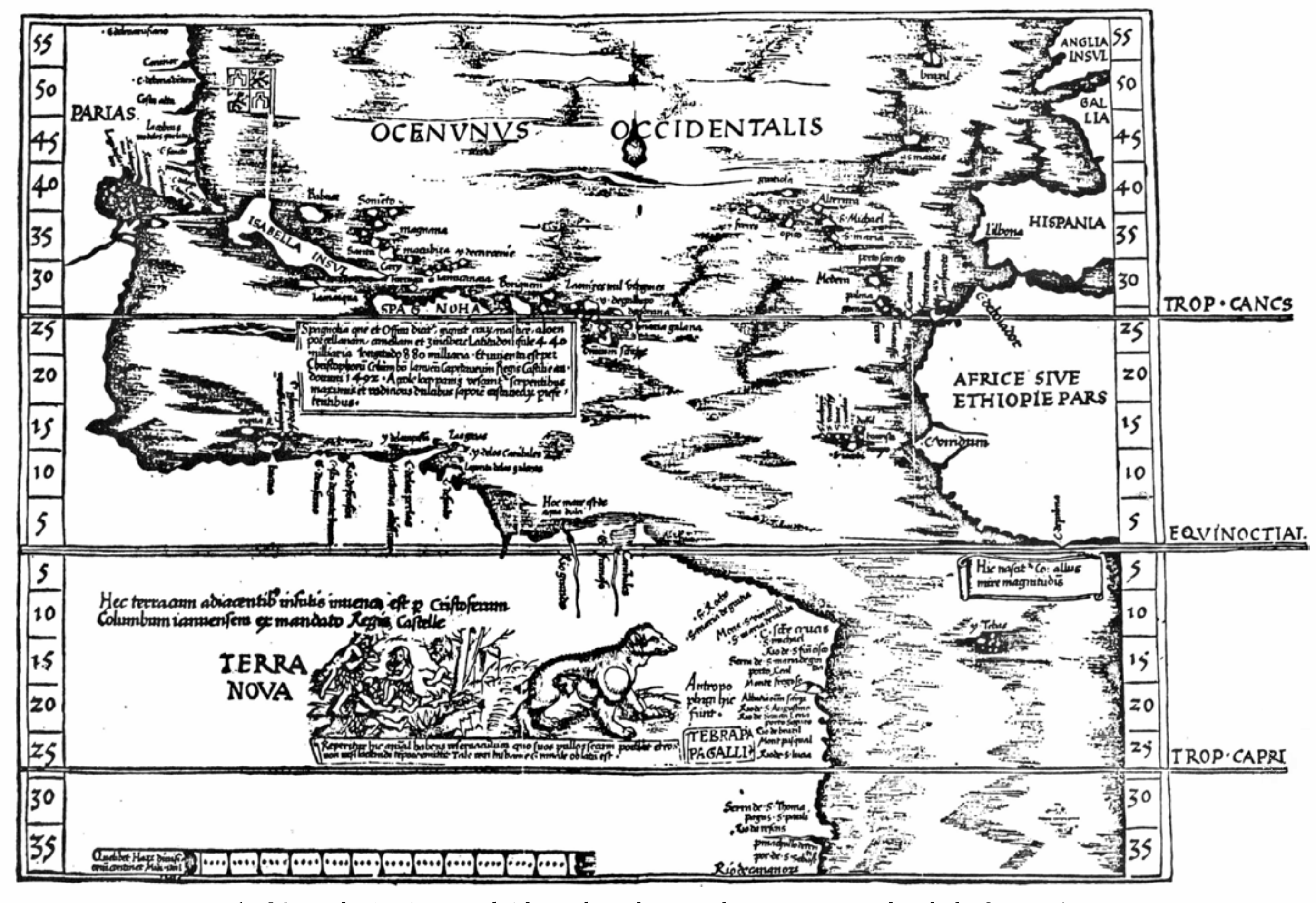
Servet nació en 1511 en la localidad oscense de Villanueva de Sijena. Su familia pertenecía a la baja nobleza, como han demostrado las investigaciones de archivo de José Barón. A los quince años entró al servicio de fray Juan de Quintana, franciscano doctorado en París y convencido seguidor del erasmismo. En 1528 residió en Toulouse, donde estudió derecho e inició su contacto con la Reforma. El año siguiente volvió a ser secretario de Quintana, quien había sido nombrado confesor de Carlos I, y asistió en Bolonia a la coronación imperial de éste.

Tras abandonar la fe tradicional y el servicio de Quintana (1530), Servet entabló relación personal en Basilea y Estrasburgo con destacados reformadores y publicó *De Trinitatis erroribus* (1531), libro que fue condenado tanto por católicos como por protestantes. Respondió a sus críticos en otra obra en la que mantuvo básicamente sus puntos de vista teológicos: *Dialogorum de Trinitate libri duo. De iustitia regni Christi capitula quattuor* (1532).

Durante los seis años siguientes, residió en París y Lyon. En esta última ciudad, trabajó para los hermanos Melchior y Gaspard Trechsel, importantes impresores para los que preparó tres ediciones de la Biblia (todas ellas aparecidas en 1542) y dos de la *Geografía* de Ptolomeo. Entabló también entonces amistad con el médico Symphorien Champier, bajo cuya influencia se interesó por la medicina. Su primera obra sobre la materia fue precisamente una *Apologia* (1536) de las opiniones de Champier en una polémica que mantuvo con Leonhard Fuchs en torno a una cuestión terapéutica.

Quizá por consejo de Champier, estudió medicina en la Universidad de París, donde asimiló el galenismo de acuerdo con el enfoque humanista de Günther von Andernach, Jacobo Silvio y Jean Fernel. En 1537 apareció la primera edición de *Syruporum universa ratio*, su principal obra médica, y poco después fue procesado por enseñar astrología judiciaria, motivo por el cual publicó *In quendam medicum apologetica disceptatio pro astrologia* (1538). Ejerció después durante algún tiempo la medicina en diversas localidades francesas, terminando por asentarse en Vienne, donde permaneció desde 1542 a 1553.

La práctica profesional y la reedición de sus libros científicos no fueron obstáculos para que continuara sus trabajos teológicos. El más importante fue la obra *Christianismi Restitutio*, ya proyectada en sus años de París y Lyon. En 1546 envió a Calvino un primer manuscrito de la misma, que indignó enormemente al reformador ginebrino. La versión definitiva acabó de imprimirse clandestinamente en enero de 1553. Tres meses más tarde, Servet fue procesado en Vienne por hereje, siendo encarcelado. Gracias a sus buenas relaciones en la ciudad, logró evadirse y anduvo errante por el Delfinado. Había sido condenado a ser quemado en efigie, por lo que, huyendo de la In-



1. Mapa de América incluido en las ediciones latinas comentadas de la Geografía *de Ptolomeo que Servet publicó en 1535 y 1541.*

SYRVPORVM
VNIVERSA RATIO,
AD GALENI CENSV-
RAM DILIGEN-
TER EXPO-
LITA.
*
Cui, poſt integram de concoctione diſceptationem,
præſcripta eſt uera purgandi methodus,
cum expoſitione Aphoriſmi:
Concocta medicari, MI-
CHAELE Villa-
nouano au-
thore.

REM MAXIMAM SIBI PROMITTIT PRVDENTIA.

LVGDVNI, APVD GVLIEL-
MVM ROVILLIVM,
M. D. XLVI.

2. *Portada de una de las ediciones del libro de Servet sobre los jarabes, su obra médica que alcanzó mayor difusión en la época.*

CHRISTIANI-
SMI RESTITV-
TIO.

Totius ecclesiæ apoſtolicæ eſt ad ſua limina vocatio, in integrum reſtituta cognitione Dei, fidei Chriſti, iuſtificationis noſtræ, regenerationis baptiſmi, et cœnæ domini manducationis. Reſtituto denique nobis regno cæleſti, Babylonis impiæ captiuitate ſoluta, et Antichriſto cum ſuis penitus deſtructo.

בעת ההיא יעמוד מיכאל השר

καὶ ἐγένετο πόλεμος ἐν τῷ οὐρανῷ.

M. D. LIII.

3. *Portada de la* Christianismi Restitutio, *que acabó de imprimirse clandestinamente en enero de 1553, nueve meses antes de que su autor fuera quemado vivo en Ginebra.*

quisición católica, trató de escapar a Suiza. En agosto, fue prendido por orden de Calvino, que lo condenó a ser quemado vivo, junto a un ejemplar manuscrito y otro impreso de su obra. La sentencia se ejecutó en Ginebra el 27 de octubre de 1553.

Dos obras acreditan a Servet como un notable seguidor del llamado humanismo científico, es decir, el movimiento centrado en un "renacimiento" de los saberes clásicos a través de ediciones, traducciones y comentarios de los textos antiguos depurados de las incorrecciones de la transmisión medieval, considerada como "bárbara". La primera de ellas es su edición latina comentada de la *Geografía* de Ptolomeo (1535), que mejoró en una reimpresión posterior (1541), tras un período en el que dio en París lecciones sobre geografía y astronomía. Utilizando textos griegos, depuró la traducción latina de Bilibaldus Pickheimer, la mejor que hasta entonces se había publicado. De esta forma culminó el esfuerzo iniciado un siglo antes por Giacomo d'Angelo, primer traductor de este texto de Ptolomeo, cuyo redescubrimiento provocó la reinstauración de la geografía "matemática" o "astronómica", caracterizada por señalar la longitud y latitud de cada lugar o accidente, frente a la mera descripción intuitiva del saber geográfico vigente en la Europa medieval. Las correcciones de Servet fueron incorporadas por los más importantes geógrafos posteriores, entre ellos, Sebastian Munster y Abraham Ortelio.

En sus comentarios, Servet se acoge a la orientación citada, afirmando que "no puede llamarse geógrafo quien carezca de formación matemática". Concede igualmente gran importancia a la cartografía. Sus ediciones llevan cincuenta mapas procedentes de las impresiones anteriores de la obra de Ptolomeo. Veintisiete son antiguos, es decir, recogidos de la transmisión manuscrita de la obra ptolemaica y, junto a otros veintitrés modernos, constituyen un auténtico "corpus" de la cartografía humanística. Servet ya no mantiene una actitud servil ante la autoridad de Ptolomeo y, apoyándose en la experiencia, critica los errores de su cartografía. Rectifica también las equivocaciones de las descripciones de países modernos que iban al dorso de los mapas, una de las cuales, relativa a América, es la única noticia de los nuevos territorios descubiertos que figura en la obra. Redactó, en cambio, un texto enteramente nuevo para el mapa de España: su famosa "De Hispania et eius ad Galliam comparatione".

La segunda contribución importante de Servet al humanismo científico es la ya citada *Syruporum universa ratio* (1537), que alcanzó cuatro reediciones en poco más de una década. La obra está dirigida contra el galenismo arabizado en el problema de la "cocción" de los humores orgánicos alterados, que se suponía provocaban los jarabes. Su finalidad era "restituir el arte curativo a su primitivo esplendor, liberarlo del yugo de las falanges sarracenas... y expurgarlo de aquello con que lo habían mancillado las corruptoras sordideces de los bárbaros".

A pesar del relieve de los aportes que acabamos de considerar, la posición que ocupa Servet en la historia de la ciencia se debe fundamentalmente a su formulación de la circulación pulmonar, la más importante rectificación que durante el siglo XVI se hizo a la fisiología galénica.

Tomando al pie de la letra varios textos del Antiguo Testamento, el médico aragonés pensaba que el alma, como emanación de la divinidad, radica en la sangre. De aquí su interés por estudiar la generación y distribución del *espíritu* sanguíneo, que le llevó a describir, ya en el manuscrito de 1546, y luego en la edición impresa de la *Christianismi Restitutio*, la circulación pulmonar. Su descripción rompe con el esquema galénico que, por una parte, aceptaba el paso de la sangre del ventrículo derecho al izquierdo a través de unos hipotéticos poros del tabique interventricular y, por otra, consideraba que la "vena arteriosa" (arteria pulmonar) era un mero vaso nutricio, mientras que por la "arteria venosa" (vena pulmonar) solamente llegaba aire al corazón. La mentalidad de Servet continuaba siendo la galénica, pero sus argumentos están basados en la observación anatómica, principalmente en el calibre de la arteria pulmonar –excesivo para un vaso nutricio–, en la disposición de los pulmones en el embrión y en la estructura del tabique interventricular.

Parece evidente que Servet desconocía la descripción de la circulación pulmonar por Ibn al-Nafis, médico egipcio del siglo XIII. En cambio, no puede decirse de modo terminante si Realdo Colombo y Juan Valverde de Amusco tuvieron noticia del texto de Servet. Lo que sí es indiscutible es que los tratados anatómicos de estos últimos dieron a conocer el descubrimiento en toda Europa, ya que el fanatismo de Calvino y de los inquisidores católicos consiguieron destruir la edición de la *Christianismi Restitutio*, de la que hoy se conservan dos ejemplares completos y uno incompleto.

Moléculas de la vida

Introducción general a un número monográfico dedicado a los mecanismos moleculares en que se basa la complejidad biológica, cuyo desentrañamiento ha impulsado una industria y planteado de raíz las cuestiones relativas a la vida

Robert A. Weinberg

La biología de 1985 difiere radicalmente de la que se exponía hace tan sólo 10 años. Las nuevas técnicas de investigación han convertido en habituales experimentos que entonces quedaban fuera del alcance del biólogo experimental más capacitado. Pero la nueva biología molecular no se ha limitado a incrementar el repertorio de técnicas de laboratorio: ha establecido una industria biotecnológica con notable rapidez. Más importante aún, ha cambiado nuestra forma de entender los seres vivos, desde las bacterias hasta el hombre.

Tradicionalmente, la biología ha sido una ciencia descriptiva, que ha catalogado la multitud de seres vivos, enumerado sus ragos característicos y examinado sus estructuras macro o microscópicas. Pero al exponer los caracteres del organismo, o fenotipo, el biólogo atendía sólo a las consecuencias de los procesos biológicos, no a los mecanismos que los causaban. El experimentador podía detenerse en la contracción de un músculo o el desarrollo de un embrión, pero tales observaciones no proporcionaban, por sí solas, las claves necesarias para una comprensión real de los mecanismos subyacentes.

El desarrollo de las técnicas de microscopía amplió considerablemente la capacidad de observación, al permitir la visualización de células y orgánulos celulares. El microscopio electrónico ensanchó aún más el campo de estudio: se pudo resolver con gran precisión la estructura fina de las células. Este avance facilitó, a su vez, el descubrimiento de nuevas estructuras y fenómenos cuyos mecanismos causales permanecían escondidos. Ni que decir tiene que la explicación se apoyaba en elementos menores que los propios componentes celulares observados por los microscopistas.

Cada vez se veía más claro que, en último término, los mecanismos causales que operaban tras muchos fenómenos biológicos dependían del funcionamiento de moléculas específicas, fuera y dentro de la célula. Este volumen de *Investigación y Ciencia* expone qué piensan los investigadores hoy de los componentes moleculares de los sistemas biológicos. Los artículos parten del supuesto según el cual describir un fenómeno biológico es mucho menos interesante que dilucidar los mecanismos moleculares que lo causan. Los biólogos moleculares que presentan aquí su trabajo manipulan cosas que jamás verán. Sin embargo, trabajan con la certeza de que esos invisibles agentes submicroscópicos que estudian, explican, en un dominio esencial, la complejidad de la vida.

La capacidad, recientemente adquirida, para descubrir y manipular moléculas, implica que la biología se halla obligada ya a abordar la vida como el producto final de una evolución que comenzó dos mil millones de años atrás, si no más. Las nuevas técnicas han permitido cambiar a voluntad elementos críticos de los moldes biológicos, creando así formas de vida que la evolución natural nunca había anticipado. A largo plazo, ello puede significar el cambio más radical derivado del poder alcanzado de manipular moléculas biológicas.

De entre las muchas clases de moléculas biológicas que encierra la célula, tres han acaparado el mayor interés: las proteínas, el ARN y el ADN. Todas son macromoléculas, es decir, moléculas de gran tamaño que forman polímeros lineales construidos a partir de unidades simples o monómeros. Hace 20 años, la atención se centraba principalmente en las proteínas. La razón, vista desde hoy, era obvia. Ciertos tejidos especializados acumulan grandes cantidades de una sola clase de proteína. Así, los glóbulos rojos son casi hemoglobina pura, el cartílago está constituido mayoritariamente por colágeno y el pelo por queratina. Los bioquímicos estudiaron dichas proteínas por la principal razón de que podían aislarlas en forma pura, y la pureza es un prerrequisito esencial para una investigación posterior.

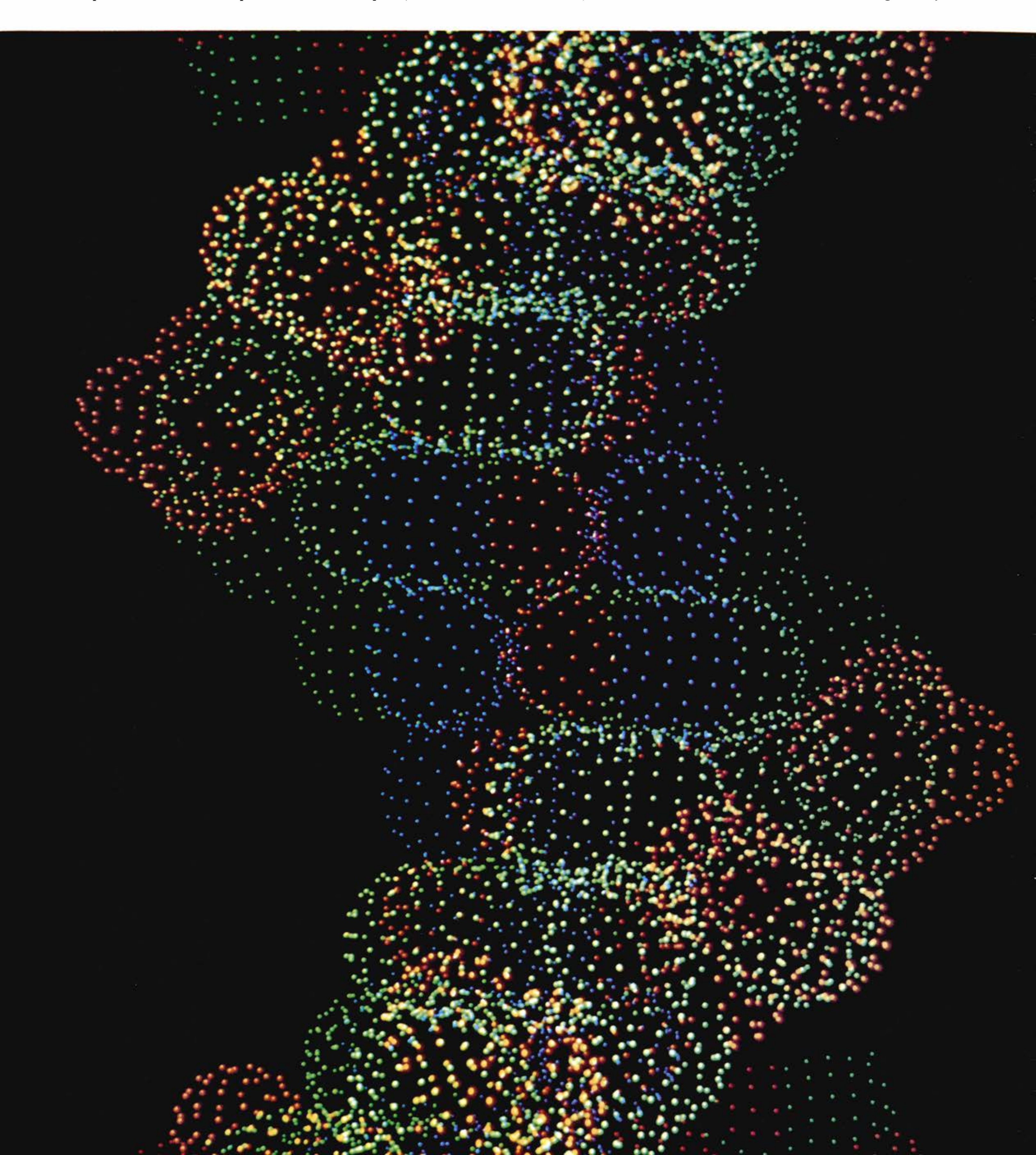
Gracias a la aparición de refinadas técnicas bioquímicas, se logró purificar proteínas que se encuentran sólo en cantidades ínfimas en el complejo caldo bioquímico de la célula viva. Los estudiosos pudieron entonces concentrarse en las proteínas que desempeñaban funciones enzimáticas, catalizando los miles de reacciones cuyo conjunto constituye el metabolismo celular. Este trabajo dio buenos resultados, pues pudiéronse reconstruir fácilmente muchas reacciones en un tubo de ensayo que contuviera la mezcla apropiada de reactivos y enzimas catalíticas.

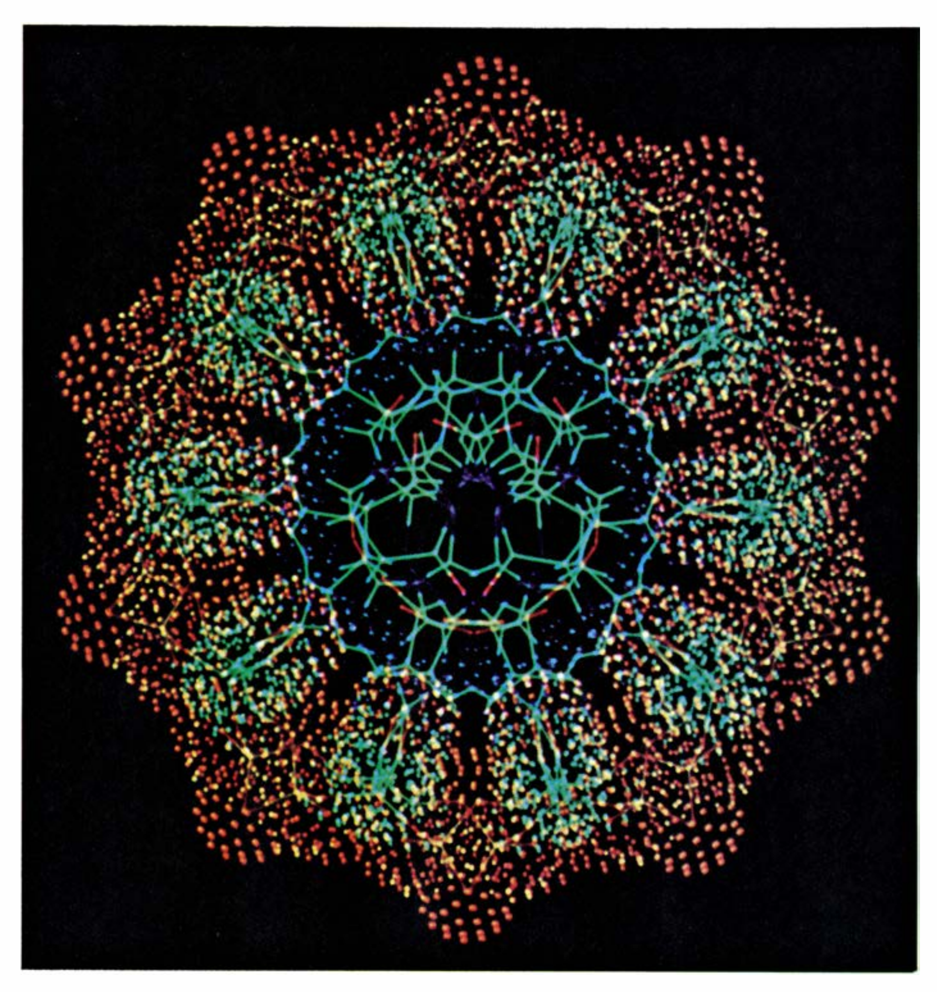
En el último cuarto de siglo, el centro de atención se desplazó gradualmente desde las proteínas hacia otras macromoléculas, primero hacia el ARN y, más recientemente, hacia el ADN. A ello contribuyeron dos razones importantes. La primera derivaba, paradójicamente, del gran éxito obtenido por la bioquímica proteica, que

1. DOBLE HELICE DE ADN. Molécula depositaria de la información genética, podría reputarse la molécula fundamental de la vida. En la página opuesta se ofrece una visión lateral de una imagen generada por computador. Las esferas representan átomos individuales: oxígeno en rojo, nitrógeno en azul, carbono en verde y fósforo en amarillo. Las regiones diagonales de la imagen delinean el armazón de azúcares-fosfato de la hélice en escalera; los elementos horizontales, constituidos por átomos de nitrógeno, carbono y oxígeno, son los pares de bases que mantienen unidas las dos cadenas de la hélice. El programa de ordenador elimina el armazón del lado más alejado de la estructura. La imagen, que representa la forma *B* de la molécula de ADN, se elaboró en el Computer Graphics Laboratory de la Universidad de California en San Francisco.

produjo una avalancha de datos sobre miles de proteínas y reacciones bioquímicas. No tardó en advertirse que el minucioso estudio de los árboles difícilmente aportaría una comprensión del bosque. ¿Quién era el responsable de la organización y orquestación de tan compleja batería de estructuras y procesos? La respuesta no residía en las proteínas, sino en la profundización de la genética y en los ácidos nucleicos, portadores de la información genética.

La aparición de la técnica del ADN recombinante constituyó la otra razón por la que los ácidos nucleicos, principalmente el ADN, pasaron a ocupar el papel central. En el transcurso de la última década, los biólogos han aprendido a manipular el ADN en una forma que (al menos habitualmente) resulta imposible para el químico de proteínas. El ADN puede cortarse, modificarse y volverse a ensamblar; puede multiplicarse (amplificarse, si aceptamos el barbarismo) en miles de copias. Más aún, con ADN se fabrica ARN y luego moléculas proteicas de la clase y constitución deseadas. La técnica experimental básica para estas manipulaciones se denomina clonación de genes, y





2. ROSETON MOLECULAR, una visión a lo largo del eje de la doble hélice *B* de ADN. En la imagen, realizada también en el Computer Graphics Laboratory, se han compactado en un solo plano 10 pares de nucleótidos consecutivos. La simetría decagonal débese a los 10 componentes nucleotídicos que hay en cada espira de la hélice. Las superficies de los grupos fosfato y azúcar del armazón se esquematizan mediante puntos que simbolizan átomos: carbono (*verde*), oxígeno (*rojo*) y fósforo (*amarillo*). El centro, sin puntos, deja al descubierto la estructura esquelética de las bases, principalmente nitrógeno (*azul*) y carbono.

gracias a ella, por encima de cualquier otro factor que consideremos, ha cambiado la faz de la biología.

El fundamento en que se asienta la clonación de los genes se levantó en 1953, cuando James Watson y Francis Crick describieron la estructura en doble hélice del ADN. Una molécula de ADN consiste en una cadena de nucleótidos, cada uno de los cuales contiene una de las siguientes bases: adenina (*A*), guanina (*G*), timina (*T*) o citosina (*C*). En una cadena de la doble hélice, *A* se aparea con *T* en la otra cadena, y *G* se aparea con *C*; ambas cadenas son, pues, complementarias. La secuencia de bases especifica el orden en que se unirán los aminoácidos para formar las proteínas. Cuando se lee (expresa) la información de un gen, se copia (transcribe) la secuencia de bases en una cadena de ARN. Este ARN mensajero (ARNm) sirve de molde para la síntesis proteica: su secuencia de bases se traducirá en la secuencia de aminoácidos de una determinada proteína.

La codificación de proteínas es sólo una pequeña parte de la función del ADN, y por tanto de la información que contiene. Mas para llegar a saber esto, así como otros sencillos hechos, fue necesario descubrir antes la organización global de las secuencias de ADN y el modo en que las unidades funcionales del mismo, es decir, los genes individuales, interactúan entre sí dentro del repertorio genético total del organismo, al que se denomina genoma.

El genoma de los organismos complejos se ha resistido al análisis hasta hace muy poco tiempo. El estudio de las propiedades bioquímicas generales del ADN celular no ofreció demasiadas esperanzas de desentrañar los pormenores de la organización genética. No olvidemos que hasta el contenido en ADN de una bacteria es muy grande; el genoma, mucho mayor, de una célula de mamífero encierra unos 2500 millones de pares de bases de información, organizadas a lo largo del ADN cromosómico. Las secuencias de bases se disponen en compartimentos de información discretos: los genes individuales. En el genoma de un mamífero hay entre 50.000 y 100.000 genes, presumiblemente responsables cada uno de especificar la estructura de un producto génico en particular, normalmente una proteína. El interés se centró entonces en el estudio individualizado de los genes, empeño que no prosperó hasta hace poco ante la incapacidad de abordarlos aislados. En ausencia de técnicas eficaces de aislamiento y enriquecimiento, los genes celulares permanecían en el reino de la abstracción. Los análisis genéticos sugerían su existencia, pero su entidad física resultaba inaccesible a los análisis bioquímicos directos.

El conflicto se solucionó parcialmente con el estudio de los virus. Comparado con el de las células, su genoma es muy pequeño; sus genes, en cambio, son similares a los de las células que infectan. El ADN genómico de uno de los virus animales más estudiados, el SV40, virus del simio, tiene solamente 5243 pares de bases, que albergan cinco genes. De esta forma, el análisis de un gen individual no quedaba confundido por el exceso de secuencias sin relación. Además, el genoma vírico se multiplica en cientos de miles de copias en la célula infectada, por lo que no fue difícil separar el ADN vírico del ADN celular.

Una vez purificado, la relativa sencillez del ADN vírico permitió estudiar aspectos, con anterioridad inaccesibles, de la estructura del gen, de la transcripción y maduración del ARN mensajero y de la síntesis de proteínas. A mediados de los años setenta, estaba aún sin resolver la estructura y la secuencia de bases del genoma vírico, cuyos 5000 pares de bases representaban un abrumador desafío para los bioquímicos, acostumbrados a estudiar los polímeros separando sus unidades una por una. Pero a partir de entonces se generalizaron dos técnicas revolucionarias que habrían de simplificar radicalmente el análisis de la estructura del ADN.

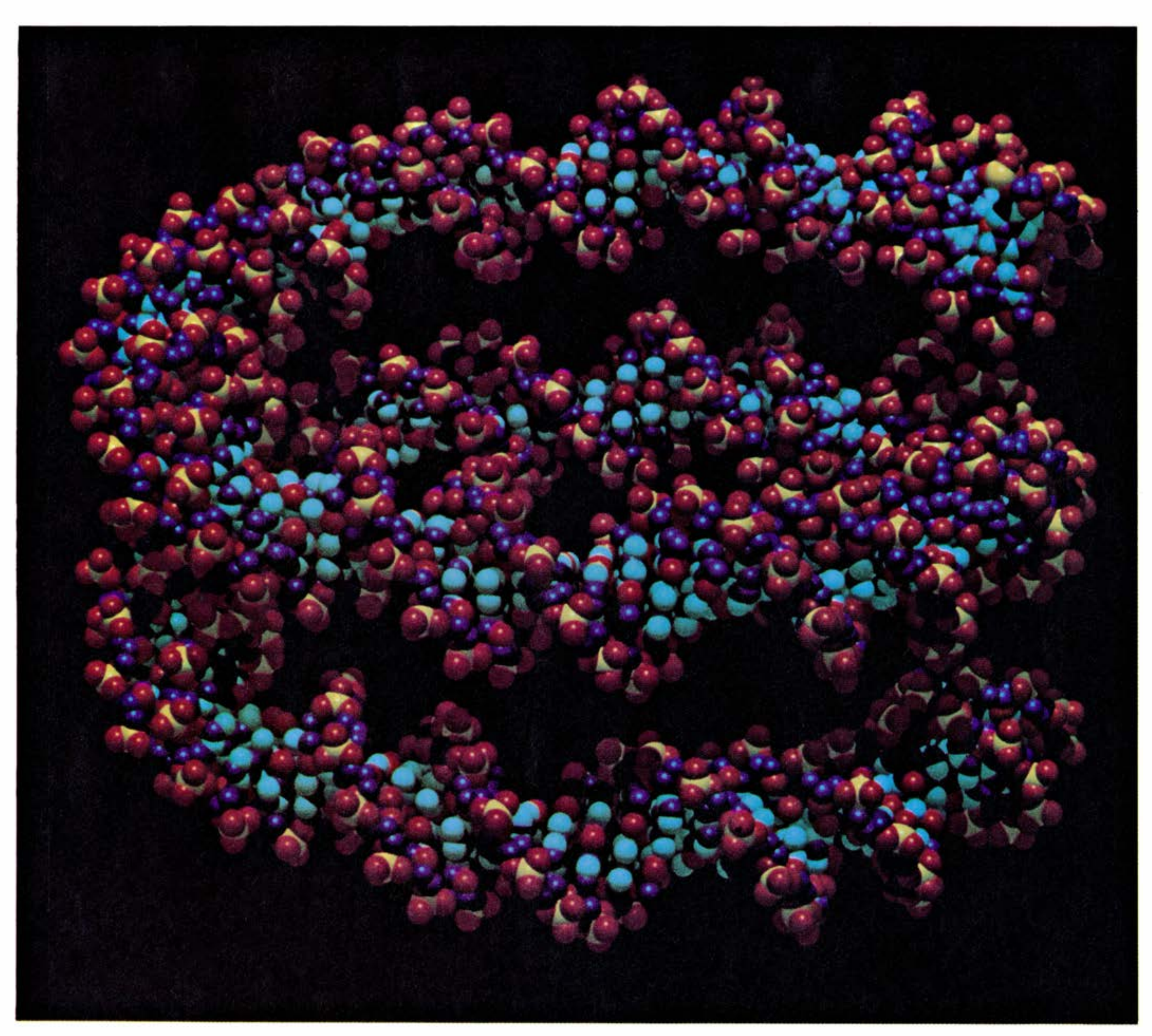
La primera de dichas técnicas procede del descubrimiento de las enzimas denominadas endonucleasas de restricción. Extraídas de bacterias, estas enzimas cortan la molécula de ADN sólo en secuencias específicas, localizadas

en distintos puntos de la doble hélice. En este sentido, una de las endonucleasas más utilizadas, *Eco*RI, corta allí donde encuentra la secuencia *GAATTC*; *Sma*I corta en *CCCGGG*, y así sucesivamente. (Las secuencias que constituyen el lugar de reconocimiento aparecen con cierta probabilidad en cualquier cadena de ADN.)

Las enzimas de restricción se han convertido en una poderosa herramienta para los investigadores. Por un lado, permiten establecer puntos de identificación en la molécula de ADN, muy difícil de caracterizar sin ese recurso. Por otro, reducen la molécula de ADN, excesivamente grande, a un conjunto de fragmentos discretos, cada uno de los cuales posee de cientos a miles de pares de bases. Dichos fragmentos pueden separarse unos de otros en razón de su tamaño mediante electroforesis en gel, y someterse a posterior análisis.

La otra revolución técnica hace referencia a la secuenciación del ADN. Se idearon varios procedimientos por los que se podía determinar, con extraordinaria rapidez, la secuencia completa de bases de un segmento obtenido mediante enzimas de restricción. Gracias a dichas técnicas se estableció, en 1978, la secuencia entera de nucleótidos del genoma del virus SV40. Dado que ya se conocía entonces el código genético, que permite traducir una secuencia de bases en el ADN a una secuencia de aminoácidos, ciertas regiones del genoma pudieron traducirse a secuencias de aminoácidos. Se dedujo así la estructura de las proteínas del SV40 a partir de la estructura de su ADN. Previamente se había determinado la estructura proteica por medio de lentos y exhaustivos análisis de las proteínas aisladas. Ahora, la rápida secuenciación del ADN permitía establecer la secuencia proteica en un tiempo mucho menor. Asimismo, la técnica ponía de manifiesto otras regiones del genoma de SV40 que no estaban implicadas en la codificación de proteínas, sino en la regulación de la expresión génica y en la replicación del ADN.

Los progresos posteriores dependieron de los procedimientos para aislar



3. EN LA SUPERHELICE DE ADN, la doble hélice se arrolla sobre sí misma. La imagen presenta un modelo tridimensional computerizado, obra de Nelson L. Max, del laboratorio Lawrence Livermore. Se cree que el ADN se empaqueta en los cromosomas del núcleo celular. Dos vueltas de la superhélice se arrollan sobre un complejo de proteínas histónicas (que aquí no aparecen). El modelo se basa en las coordenadas determinadas por Joel Sussman y Edward Trifonov.

distintos genes celulares. En este campo, el éxito se lo apuntó la genética bacteriana, en trabajos iniciados a principios de los años 70. Los procesos para aislar genes, generados por dichos estudios, se basan en último término en la semejanza entre la organización molecular de todos los organismos, de bacterias a mamíferos. Consecuencia de ello es que los ADN bacterianos y de mamíferos son estructuralmente compatibles; segmentos de ADN procedentes de una forma de vida pueden mezclarse de forma efectiva con los de otro organismo.

La semejanza en la estructura del ADN la comparten muchos bacteriófagos (virus que infectan a las bacterias) y plásmidos (pequeños anillos de ADN parásitos de bacterias). Los fagos inyectan su ADN en una bacteria; la inducen a replicarlo numerosas veces y a empaquetar el ADN recién sintetizado con una cubierta de proteínas víricas; por último, matan a la bacteria. Los fagos descendientes, liberados de la célula, irán a infectar a otros huéspedes susceptibles de serlo. Los plásmidos, de naturaleza más simple, presentan una mayor relación simbiótica con las células donde se desarrollan. Pueden portar genes que confieren ciertas ventajas a las células huésped, verbigracia, resistencia a antibióticos. La célula huésped, a su vez, deja que el ADN plasmídico se replique en ella hasta cierto punto, asegurando así la presencia continuada del plásmido en las bacterias hermanas originadas por división de la bacteria paterna.

Algunos fagos y plásmidos de ADN son pequeños (como el SV40); varía su complejidad desde algunos miles de bases hasta unas 50.000. Ese tamaño facilita la manipulación y reestructuración mediante múltiples técnicas recientemente desarrolladas. Las moléculas se aislan sin dificultad, intactas y en grandes cantidades. Se corta el ADN por determinados puntos con enzimas de restricción y los fragmentos resultantes se recombinan entre sí para reconstruir la molécula original o unirse a segmentos de ADN extraño y formar una molécula híbrida. El ensamblaje se realiza gracias a enzimas de origen bacteriano, fácilmente asequibles: las ADN-ligasas, que reconocen los extremos de las moléculas de ADN fusionándolos, sin dejar después rastro del punto de unión.

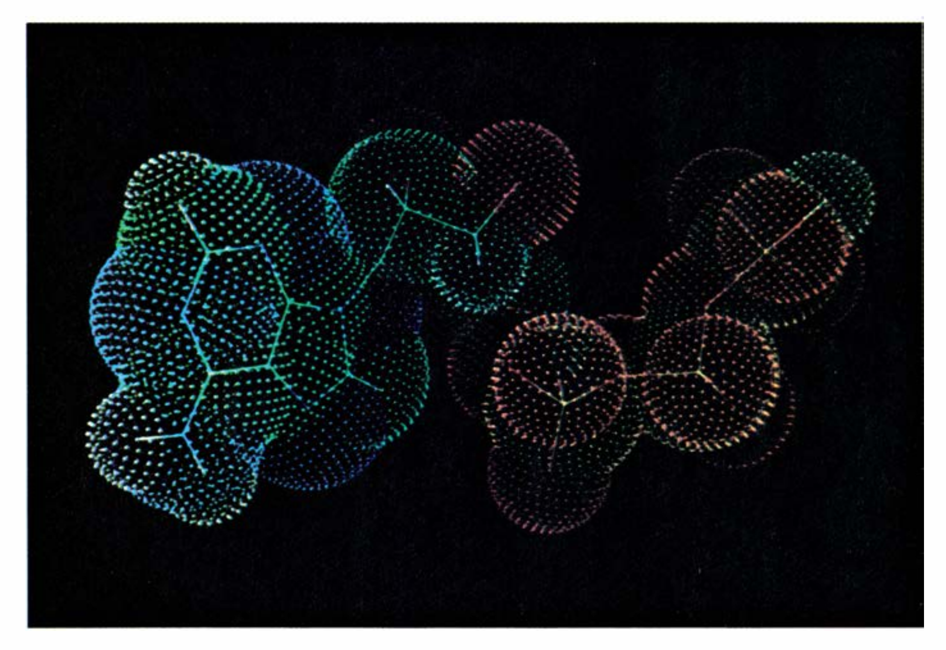
El ADN híbrido formado por un plásmido fusionado con material genético extraño de una mamífero, por ejemplo, puede replicarse ya introducido en la célula bacteriana. Ello significa que el genoma del plásmido puede servir de "vector" para establecer y multiplicar el ADN extraño en la bacteria. El vector fago funciona de modo parecido y se utiliza también para transportar el ADN extraño de una bacteria a otra. Cuando, en el transcurso de la replicación, se copia el ADN vector, el ADN extraño insertado se copia a su vez.

El proceso de clonación comienza con todo el ADN celular de un organismo, de un mamífero, por ejemplo. Se corta el ADN en fragmentos de un tamaño (entre 1000 y 30.000 pares de bases) adecuado a la capacidad de transporte del vector. (Un genoma complejo, así el del hombre, podría fragmentarse en cientos de miles de segmentos de ADN.) Cada uno de ellos se insertará por separado en una molécula de ADN vector. El proceso no requiere un cuidadoso montaje molécula a molécula efectuado por un técnico puntilloso; antes bien, se mezclan millones de moléculas de ADN vector e insertado, terminando el proceso en pocos minutos mediante la adición de ADN-ligasa. Si el manojo de moléculas híbridas resultante es suficientemente grande, hallaremos algún gen de interés en los segmentos de ADN unidos a las moléculas vectoras.

Cada una de estas moléculas híbridas, en parte vector y en parte ADN de mamífero, se introduce luego en una célula bacteriana, donde se replicará numerosas veces. Cada molécula híbrida produce una población hija separada, cuyos individuos serán, todos ellos, idénticos a su fundador. Este tipo de colonias recibe el nombre de clon, por reflejar su carácter descendente un ancestro común y la identidad de todos sus miembros.

El término "clon" ha adquirido un nuevo significado. Se aplica específicamente a las unidades de ADN extraño insertado en las moléculas híbridas de la población. Cada segmento insertado residía originalmente en el ADN de un genoma complejo, entre millones de otros segmentos de ADN de tamaño y complejidad comparables. Cuando acaban las manipulaciones descritas, el mismo segmento se halla presente en forma pura dentro de los confines de una población clonal determinada, contaminado sólo por el ADN vector asociado. El segmento de ADN insertado se ha aislado de su anterior entorno y se ha multiplicado selectivamente: se ha clonado, por cuya razón el propio ADN, insertado y purificado, también constituye lo que se llama a menudo un "clon".

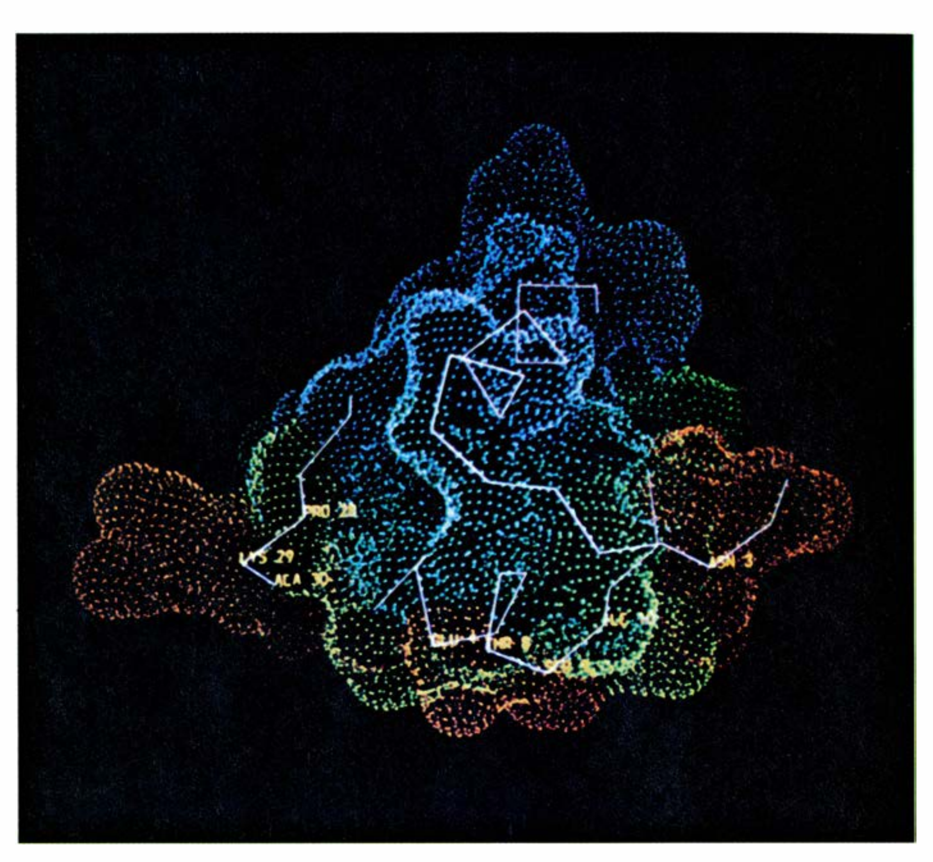
El proceso de clonación consta de una etapa más, que, con frecuencia, es la que supone un mayor desafío. El proceso de inserción y multiplicación



4. ATP son las siglas de trifosfato de adenosina. Esta molécula proporciona la energía libre necesaria para muchas reacciones bioquímicas, entre las que recordaremos las requeridas para la polimerización del ADN, el ARN y las proteínas. La imagen muestra un modelo del ATP realizado por Computer Graphics Laboratory. Se trata de un nucleótido constituido por la base adenina (*a la izquierda*), el azúcar ribosa y tres grupos fosfato (*a la derecha*). Al añadir el tercer fosfato al difosfato de adenosina, por la oxidación de moléculas combustibles o en el caso de las plantas durante la fotosíntesis, se almacena energía. Esta se cede al romperse la molécula de ATP, liberándose así el tercer grupo fosfato. Las líneas indican la estructura esquemática de la molécula; los puntos delimitan las superficies efectivas de los átomos que constituyen la misma.

produce centenares de miles de poblaciones clonales distintas, descendientes cada una de una sola molécula de ADN híbrido. Si los híbridos iniciales se diluyen bien antes de su multiplicación, cada población clonal descendiente estará físicamente separada de las otras poblaciones que llevan insertado un ADN distinto. Una vez establecida esta enorme batería (o "banco") de clones diferentes, el investigador debe enfrentarse a la identificación de una o varias poblaciones que portan insertado un ADN de interés.

La identificación será sencilla en el caso de que hubiéramos clonado con anterioridad el gen o el fragmento de ADN en cuestión. El ADN previamente clonado lo podemos marcar con un isótopo radiactivo: en condiciones adecuadas, el ADN marcado se unirá preferentemente con el clon de interés (ya que las cadenas complementarias de ADN se "hibridan" por apareamiento de bases) y lo identificará. Sin embargo, la clonación más interesante consiste en aislar genes que nunca se hayan clonado con anterioridad, ni siquiera de una forma relativa. Para solventar este problema, se han desarrollado varias estrategias sutiles. El objetivo se centra en desarrollar una sonda específica que examine el banco de clones e identifique aquellos que nos convengan.



5. MOLECULA DE INSULINA, una hormona con múltiples funciones. La imagen muestra un modelo computarizado elaborado por Elizabeth D. Getzoff, J. A. Tainer y Arthur J. Olson, de Scripps Clinic, con el mismo soporte lógico con el que se obtuvo la imagen de la portada. La insulina es una hormona proteica pequeña, constituida por dos cortas cadenas de aminoácidos unidas. Las líneas trazan el armazón de las dos cadenas peptídicas; los puntos delinean la superficie accesible al solvente. El coloreado refleja la movilidad relativa de los constituyentes: los átomos en rojo y naranja son los más sujetos a desplazamientos respecto a su posición media en un cristal de insulina, mientras que los verdes y azules son los menos móviles.

Una estrategia ideada para la consecución de estas sondas se funda en el dato siguiente: ciertas células especializadas fabrican determinadas proteínas en gran cantidad. Así, por ejemplo, los precursores de los glóbulos rojos sintetizan globina (el componente proteico de la hemoglobina) en mayor cantidad que cualquier otra proteína. El ARN mensajero que dirige su síntesis abunda también, y hay métodos para aislarlo fácilmente de otros ARN mensajeros de la misma célula. El ARNm aislado, o una copia en ADN del mismo, puede servir de sonda, ya que se hibridarán con la correspondiente secuencia génica en el banco de clones. Existen refinadas versiones de esta estrategia que permiten aislar selectivamente el ARNm deseado de entre el exceso (miles de veces mayor) de otras moléculas de ARNm presentes en la célula.

Con frecuencia, la proteína cuyo gen interesa es rara, por lo que no se puede aislar fácilmente su ARNm. En ese caso, se purifica una pequeña cantidad de la proteína y se determina la secuencia de aminoácidos de algunas partes de la misma. Al conocerse el código genético, se puede traducir la secuencia de aminoácidos y saber así qué secuencia de bases presenta el gen que codifica la proteína. Ensamblando artificialmente nucleótidos se sintetizan pequeños fragmentos de ADN que correspondan a la secuencia de bases deducida. Los fragmentos de gen fabricados por el hombre sirven de sonda para identificar el gen buscado.

Hay otra estrategia más que parte inicialmente de proteínas. Se basa en la existencia de un anticuerpo dirigido contra la proteína cuyo gen se desea clonar. Las bacterias infectadas por un fago que transporte el gen deseado sintetizan pequeñas cantidades de la proteína en cuestión, de forma que el banco de fagos puede ser examinado por el propio anticuerpo que se unirá a la proteína y, por tanto, identificará el clon que transporta el gen.

Con estas y otras estrategias experimentales, la técnica actual está dotada para clonar cualquier gen cuyo producto proteico sea conocido y pueda ser aislado, aunque lo sea en pequeñas cantidades. Siempre y cuando haya un interés suficiente, cualquiera de los genes que determinan los cientos de enzimas que ya han estudiado los bioquímicos puede ser aislado. Los genes de importantes proteínas estructurales de la célula, incluidas las que determinan la arquitectura celular, se han clonado ya. También se han aislado otros genes que codifican mensajeros intercelulares como la insulina, el interferón, las interleucinas y varios factores del crecimiento. Es más, la clonación y desciframiento de los genes son más rápidos que la completa interpretación de los nuevos datos. Muchas secuencias van quedando almacenadas en bancos de datos; quizá las futuras generaciones de biólogos, ayudadas por nuevos procedimientos analíticos, lograrán interpretarlos completamente.

Los genes que determinan proteínas conocidas son sólo una pequeña fracción del repertorio genético total de un organismo complejo. Muchos de los restantes genes probablemente codifican también proteínas, pero su existencia se deduce sólo a partir de los efectos que ejercen la estructura y funcionamiento tanto en la célula como en el or-

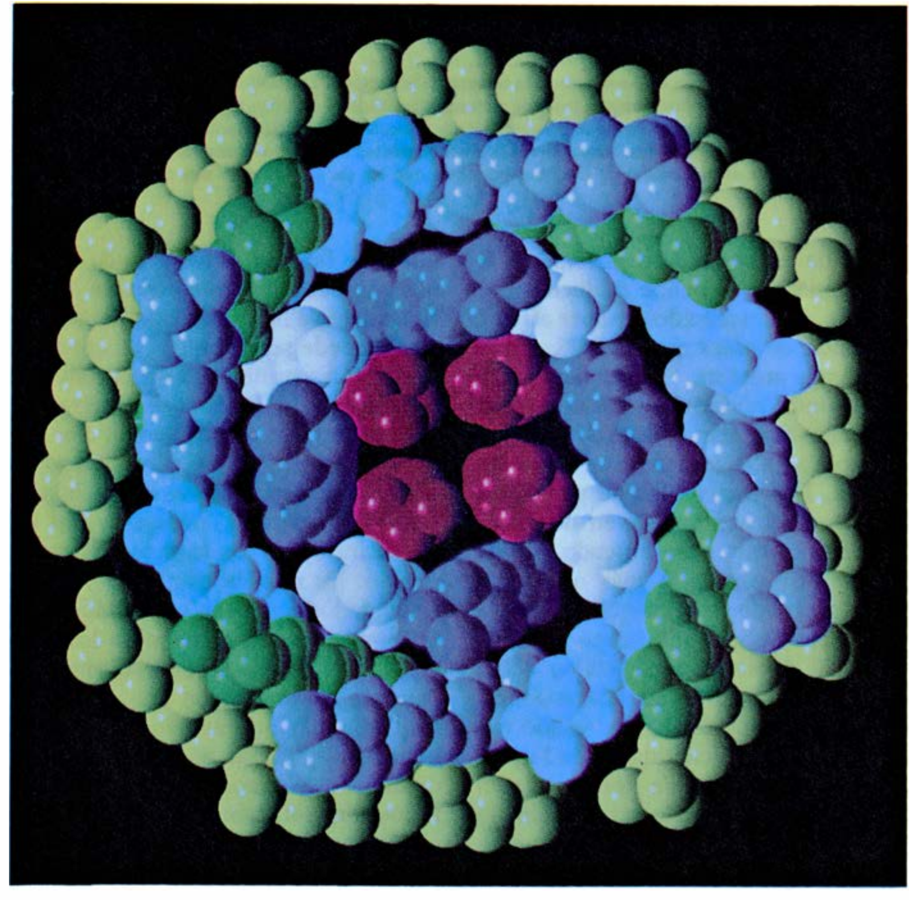
ganismo entero. Algunos de ellos especifican conversiones bioquímicas en la célula, otros gobiernan los complejos procesos que determinan el crecimiento y la forma del embrión en desarrollo y unos terceros responden de características del comportamiento de los organismos. Este tipo de genes se conocen todavía muy poco, pues los medios para identificarlos en los bancos genómicos son muy limitados.

El flujo de genes desde el genoma hasta el banco de genes brinda mayores posibilidades que la descripción detallada del ADN y la estructura proteica. Una vez clonado, el gen se inserta en una célula extraña, que se verá obligada a expresarlo. La célula sintetizará entonces la proteína que el gen codificaba en su antiguo entorno.

El gen a expresar se extrae del vector donde se había clonado y se le somete a importantes modificaciones. Cambios que son necesarios, ya que los genes de mamífero llevan secuencias reguladoras que promueven su transcripción en ARNm en la célula original, pero no en una célula bacteriana. Por ello, se reemplazan por secuencias reguladoras bacterianas. El gen modificado se introduce en un "vector de expresión", un plásmido diseñado para facilitar la expresión del gen en un ambiente celular extraño. Se introducen entonces los genes de mamífero con las secuencias reguladoras bacterianas (o un gen vegetal tratado de forma similar) en el huésped seleccionado, por lo general una bacteria o una levadura.

El gen rediseñado para lograr una elevada tasa de expresión en bacterias o levaduras determina que se fabrique abundante proteína que, en el entorno original, se sintetizaba sólo en pequeñas cantidades. Al conseguirse así importantes ventajas económicas, se ha convertido en piedra angular de la industria biotecnológica. Se provoca el desarrollo de microorganismos con genes clonados en grandes tanques fermentadores a bajo costo, aumentando de ese modo enormemente la producción de proteína. Entre los productos manufacturados así (o cuya fabricación está en proyecto) recordaremos la insulina, el interferón (para combatir infecciones y quizás el crecimiento de tumores), la uroquinasa, un activador del plasminógeno (para disolver coágulos sanguíneos), renina (para la fabricación de queso a partir de leche), un factor de necrosis tumoral (para una posible terapéutica del cáncer), celulasa (enzima para la obtención de azúcar a partir de la celulosa de las plantas) y péptidos víricos que actúan de antígenos (para la creación de nuevas vacunas, más seguras).

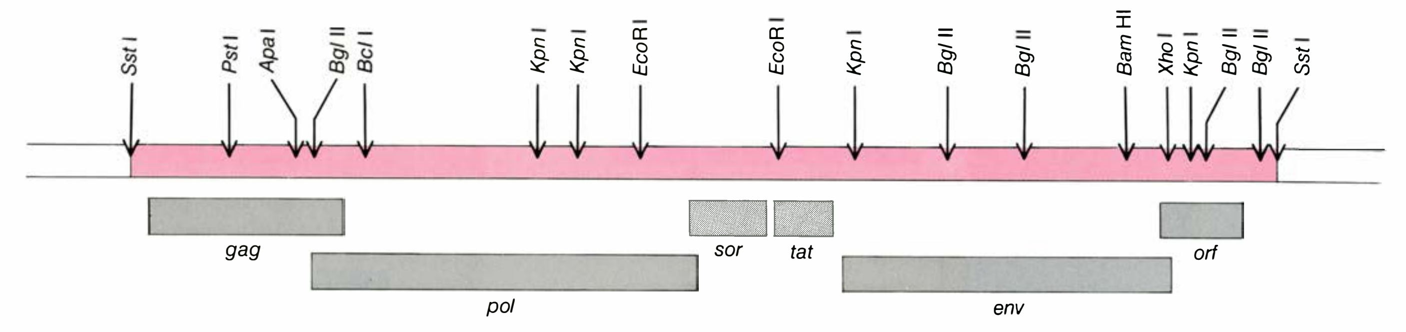
Otra versión de la inserción génica supone la implantación de los genes de mamífero, una vez clonados en bacterias, en células de mamífero en cultivo y no en microorganismos. El cultivo de células de mamífero no puede realizarse al bajo coste y en las grandes cantidades que caracterizan a los cultivos bacterianos o de levaduras; en su favor hemos de citar, sin embargo, las pequeñas, pero importantes, modificaciones que se consiguen en las proteínas determinadas por genes de mamífero. En este orden, algunas de estas proteínas operan mejor si añadimos cadenas laterales de azúcares o lípidos al esqueleto aminoácido; dicha adición se efectúa de forma rutinaria en las células de mamífero, pero no así en las bacterias.



6. CANAL DE SODIO, una gran proteína que se halla inmersa en la membrana de las células nerviosas, cuyo modelo fue realizado por H. Robert Guy, del Instituto Nacional del Cáncer. Esta imagen de un modelo generada por computador fue obtenida por Richard J. Feldmann, del norteamericano Instituto Nacional de la Salud. La proteína facilita el paso de iones sodio al interior de la neurona, lo que genera el potencial de acción, el pulso de voltaje, que en último término conduce a la emisión de un neurotransmisor. La proteína consta de cuatro dominios idénticos, cada uno de los cuales incluye ocho subestructuras proteicas distintas. Los grupos de esferas de igual color representan las cuatro versiones homólogas de cada subestructura. (En cada dominio hay dos subestructuras muy parecidas; las dos se han representado en verde pálido.)

Los genes clonados no sólo pueden insertarse en microorganismos o en células en cultivo, sino también en el genoma de un organismo pluricelular intacto, animal o vegetal. En este caso, los objetivos son distintos del que rige la ingeniería genética de organismos unicelulares, que es la consecución a gran escala de los productos génicos deseados. Plantas y animales se modifican genéticamente en un intento por alterar ciertas características: tasa de crecimiento, resistencia a las enfermedades y capacidad de adaptación a un nuevo ambiente.

El problema de la implantación de genes en un organismo pluricelular difiere del relativo a la transferencia génica a un cultivo de un solo tipo celular. Un gen clonado introducido en la mayor parte de los tipos celulares de un animal o vegetal puede alterar el comportamiento tan sólo de las contadas células que han adquirido el gen. Obviamente, reviste mayor interés producir el cambio en el organismo entero



7. MAPA ENZIMATICO DE RESTRICCION del genoma del virus HTLV-III, el agente del SIDA. Se ha confeccionado en el laboratorio de Robert C. Gallo, del Instituto Nacional del Cáncer. Estos mapas son el primer medio que tiene el biólogo molecular para representar la organización de una cadena de ADN. Este se fragmenta por una endonucleasa de restricción, enzima que corta ADN en puntos específicos. Se puede conocer el tamaño de los fragmentos por el camino recorrido en un gel de electroforesis. Los fragmentos se clonan y secuencian. El tratamiento del genoma con distintas enzimas de restricción proporciona una señalización adicional. El mapa, relativamente sencillo, de HTLV-III muestra los puntos en que varias enzimas de restricción cortan el ADN de este virus (*arriba*) y la localización de diversos genes (*abajo*). Por ejemplo, *env* (de envoltura) determina el antígeno de superficie del virus, el gen *pol* (de polimerasa) codifica la enzima que copia el ARN del virus en ADN (una transcriptasa inversa). La longitud de este ADN es de 9,3 kilobases (una kilobase son mil pares de bases).

y sus descendientes. Ello lleva a la implantación de genes en las células germinales (espermatocitos o huevos), que transmiten la información genética de padres a hijos.

Se dispone ya de técnicas preparadas para implantar genes en las líneas germinales de mamíferos, moscas y ciertas plantas. Se puede lograr tanto por inyección física directa del gen clonado en los primeros estadios del embrión, o usando un vector vírico que transporte el gen hasta las células embrionarias. Nuevamente, el animal (o planta) resultante llevará el gen implantado en sólo algunas de sus células, pero ahora es factible que el gen se localice en algunas células germinales. Dicha presencia permite que algunos de los organismos descendientes hereden el gen implantado junto a otros genes paternos; por tanto, ese gen se encontrará en todas sus células. Una vez incorporado en la línea germinal de los organismos progenitores, el gen se irá transmitiendo y afectará a su descendencia.

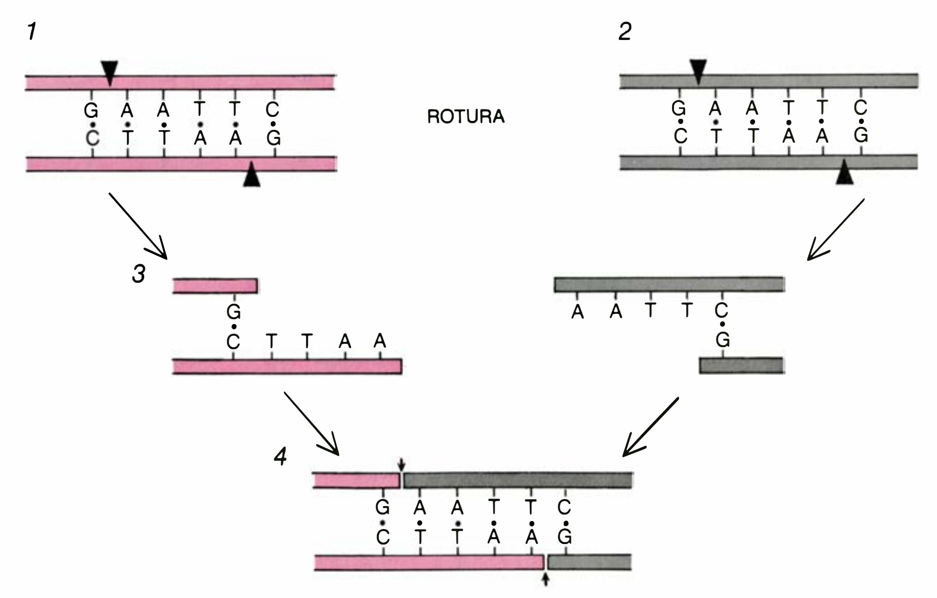
Por el momento, y quizá para siempre, las técnicas de implantación en la línea germinal están limitadas por muchos factores. No se puede dirigir al ADN extraño para que se inserte (se integre) en un punto concreto del cromosoma; el locus de inserción se produce al azar. No se puede sustituir un gen existente en el organismo eliminándolo, sino que el gen implantado se añade al genoma ya existente, agrandándolo. Además, los genes extraños no siempre funcionan con la precisión de los genes propios, que se activan y desactivan en los momentos adecuados del desarrollo.

Aún así, la técnica de inserción en la línea germinal es una herramienta poderosa. Se han conseguido ratones que transportan y transmiten a su descendencia genes adicionales de hormonas del crecimiento. Los ratones gigantes (casi un 50 por ciento mayores de lo normal) han constituido un primer paso; pronto se conseguirá ganado con propiedades del crecimiento alteradas. Se han desarrollado moscas que llevan una gran variedad de genes implantados, abriendo nuevas vías al conocimiento de la biología molecular del desarrollo de este organismo. También se está ensayando con plantas que transportan genes que confieren resistencia a los herbicidas. A medida que mejoran las técnicas de implantación y se clonan nuevos genes, aumentan las posibilidades de alterar los rasgos de los organismos. La biología molecular ya no tendrá que contemplar las formas de vida como productos acabados de la evolución, sino que participará activamente iniciando los cambios en los organismos.

Para los biólogos experimentales, la clonación y sus técnicas asociadas han alcanzado y mantendrán un papel preeminente. La clonación permite analizar un sistema biológico en tres niveles. Primero, nos faculta para aislar los genes implicados en un problema biológico, dilucidar la secuencia de su ADN y conocer su funcionamiento y regulación. En segundo lugar, una vez clonado el ADN de un gen, se puede obtener, para su estudio, gran cantidad de ARN por él transcrito. El ARN puede actuar de muchas formas para modular la expresión de los genes; la estructura y maduración del ARN son, pues, factores clave para la total comprensión del funcionamiento de los genes. En tercer lugar, quizá la mayor ventaja de la técnica de clonación deriva del análisis de las proteínas codificadas por un gen. ¿Cómo actúan las diversas proteínas para provocar las múltiples respuestas de la célula? Las proteínas que antaño sólo se hallaban disponibles para su estudio en cantidades muy pequeñas, pueden fabricarse actualmente en abundancia, una vez aislados sus genes. En suma, se puede disponer de todos los componentes macromoleculares principales de un sistema biológico en gran cantidad y en forma pura.

De pareja importancia es la capacidad de alterar un sistema biológico, recientemente adquirida. Se pueden modificar los genes y las proteínas por ellos determinadas, y, con ello, inducir nuevas funciones en el ADN y en las proteínas. También pueden alterarse las relaciones entre los componentes interactuantes de un sistema biológico para generar nuevos comportamientos del sistema en conjunto, que a menudo resultan muy reveladores. La modificación de los genes se consigue cambiando la secuencia de ADN mediante lo que se conoce por mutagénesis dirigida. Para lo cual, basta con sustituir un fragmento, obtenido por enzimas de restricción, por otro distinto en medio del gen clonado. Y podemos incorporar en un gen segmentos de ADN de síntesis química, reemplazando o añadiéndose a una secuencia de información ya existente. También se puede sustituir un solo nucleótido, creando mutaciones puntuales, cambio éste el más sutil que puede producirse en un gen. Los cambios genéticos acumulados en un gen tras cientos de millones de años de evolución natural pueden ser imitados y sustituidos en varias semanas de manipulaciones en el laboratorio.

Los genes alterados mediante dichas técnicas pueden introducirse de nuevo en los sistemas biológicos, con los que



8. LA CLONACION SE VE FACILITADA por los "extremos adherentes" generados por enzimas de restricción. *Eco*RI realiza un corte en la secuencia *GAATTC*. Al cortar con *Eco*RI un ADN genómico (*1*) y un ADN vector (*2*), los extremos de los fragmentos resultantes presentan cadenas simples de bases complementarias (*3*). Cuando se mezclan los fragmentos, se forman puentes de hidrógeno (*puntos*) entre dichas bases, uniendo ADN genómico y vector (*4*). La enzima ADN ligasa (*flechas*) suelda la unión de modo irreversible.

interacciona normalmente: cabe modificar una enzima, con baja afinidad por el sustrato sobre el que actúa, para que dicha afinidad aumente considerablemente, e incluso para que actúe sobre un compuesto nuevo; una proteína que normalmente se transporta hacia un compartimento celular puede redirigirse hacia otro punto de la célula; puede obligarse a un gen, cuya expresión es estimulada por un agente dado, a responder ante una señal completamente distinta. En definitiva, el biólogo molecular, al alterar los genes que organizan un sistema biológico, puede cambiar las habituales relaciones entre sus elementos, de suerte tal que muestre cómo trabaja el sistema. En el futuro, muchos biólogos considerarán los sistemas biológicos series bien definidas de partes mecánicas que pueden ser desmontadas, modificadas y reensambladas bajo las directrices de la mecánica molecular.

Dista mucho de estar claro, sin embargo, que los intentos por reducir los sistemas complejos a componentes pequeños y sencillos puedan, llevados al límite, proporcionar conocimientos adecuados para dominar el gran problema con el que hoy se enfrenta la biología: describir el funcionamiento global de un organismo complejo. ¿Cabe entender la biología de un mamífero como mera suma de un gran número de sistemas, cada uno de ellos controlado por un gen distinto y bien definido? Seguramente no. Sería mucho más realista considerar que las interacciones de la compleja red de genes, productos génicos y células especializadas sirven de base para muchos aspectos de las funciones de los organismos. Los genes de un organismo no han evolucionado aislados, sino en el contexto de otros genes con los que han interaccionado continuamente durante el largo período del desarrollo evolutivo. La mayoría de los biólogos admitiría que todavía no posee las herramientas conceptuales necesarias para comprender enteramente los sistemas biológicos complejos o los procesos que presentan múltiples componentes que interactúan entre sí; verbigracia, el proceso de desarrollo embrionario.

La clonación de genes ha arrojado luz sobre otro aspecto de la biología: la historia del desarrollo evolutivo. El hombre, que apareció en su forma actual hace sólo cientos de miles de años, y no muchos, está conociendo a pasos agigantados sucesos evolutivos que, 1000 o 2000 millones de años atrás, empezaron a moldear las formas de vida que hoy en día pueblan la Tierra. La etapas que generaron las primeras células quizá no se descubran nunca, pero gracias a la clonación y a la secuenciación de genes se están identificando muchos de los cambios subsiguientes, memorizados en el ADN de los organismos actuales. Mediante el análisis de su ADN clonado se puede establecer, con bastante claridad, la proximidad evolutiva entre los organismos. Asimismo, se han desarrollado

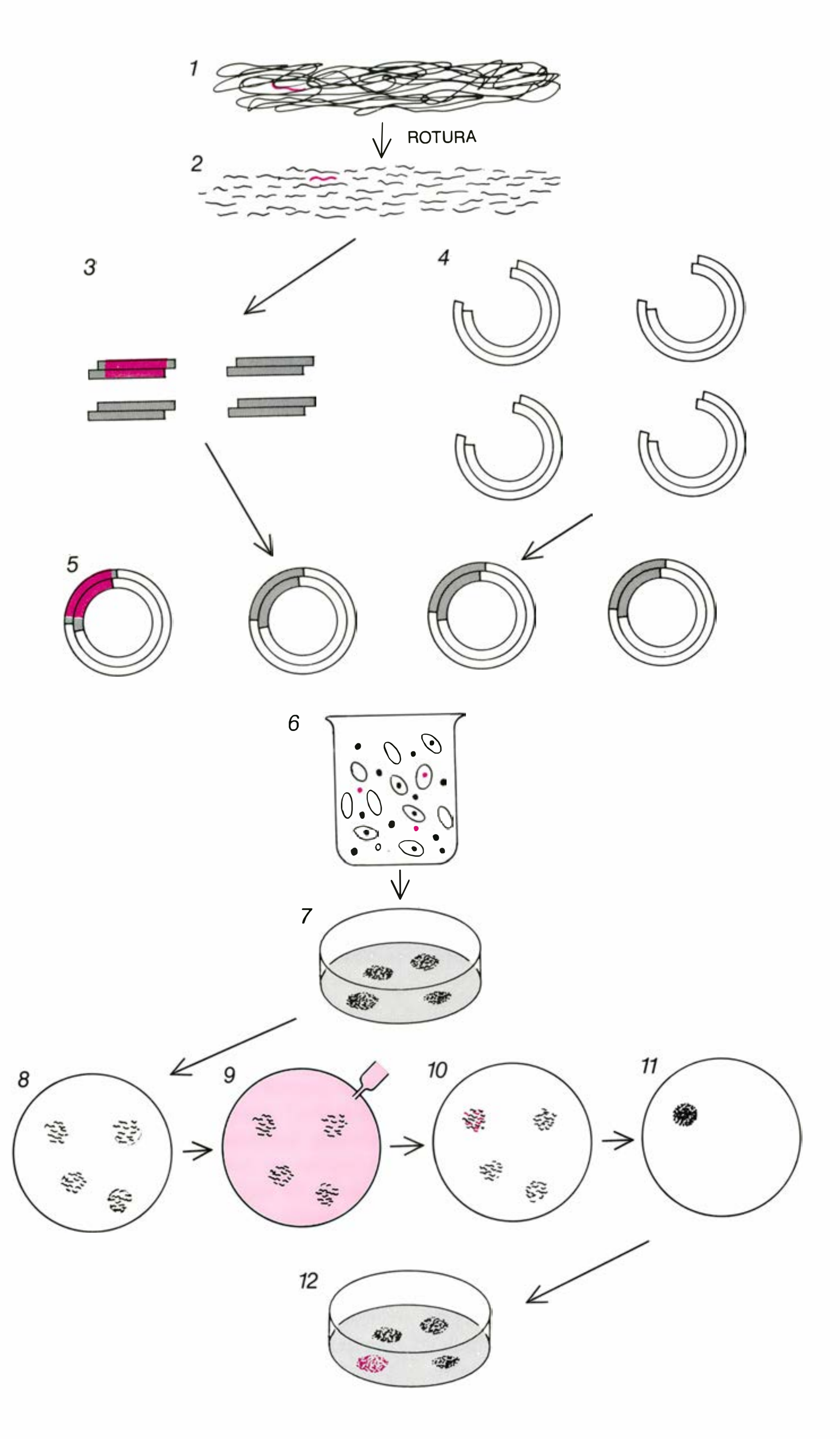
refinados programas de computadora para ayudar a analizar dichas secuencias y determinar las relaciones evolutivas.

La notable conservación de secuencias ancestrales a lo largo de una amplia distancia evolutiva es lo que posibilita reconstruir la genealogía de la vida. Para la biología molecular, dicha conservación ha constituido una gran ventaja práctica en otro orden. Genes y los problemas a ellos asociados que resultan inabordables en un determinado organismo pueden estudiarse en otra especie de manipulación más fácil.

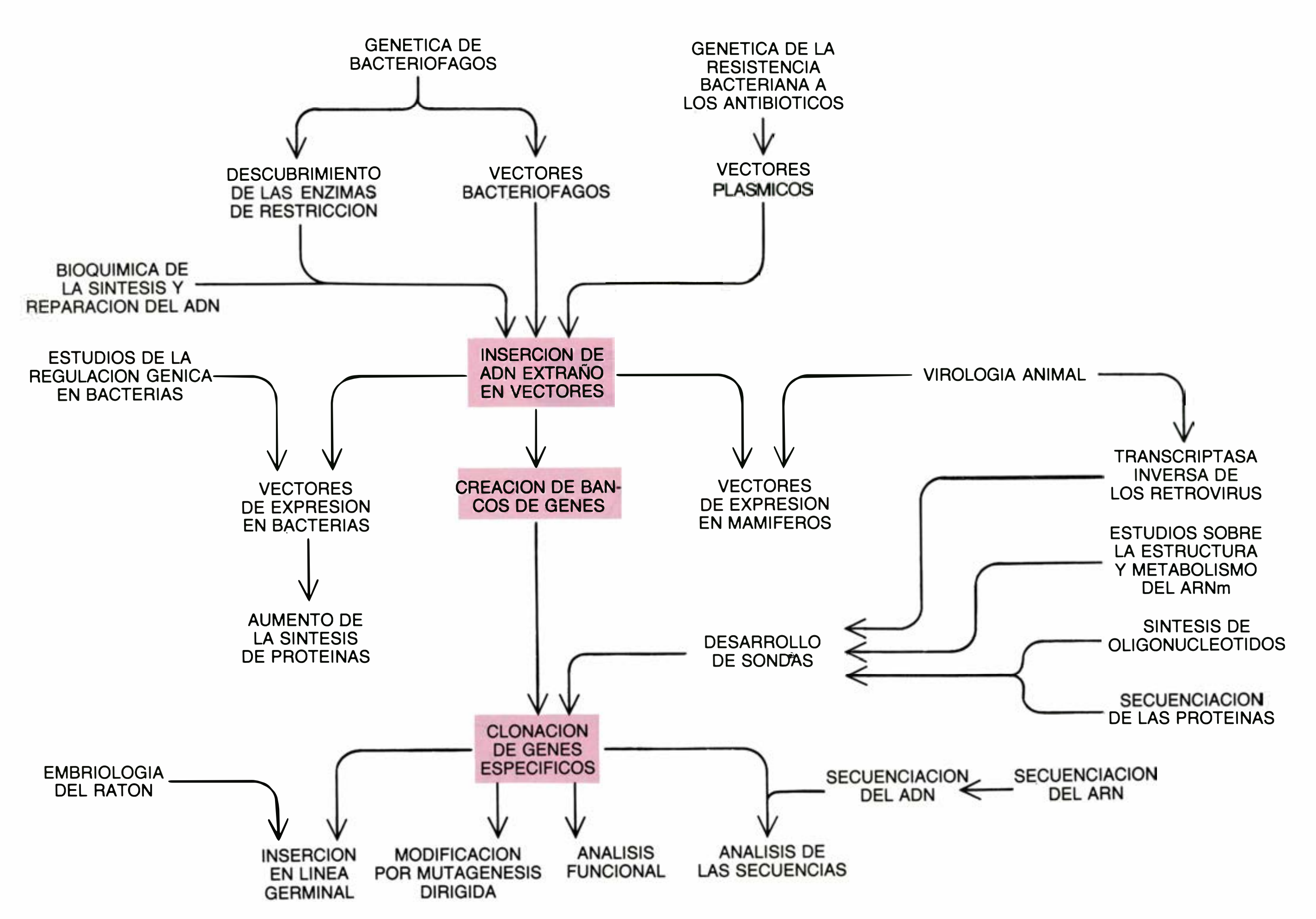
A modo de ejemplo: existen ciertos oncogenes (genes del cáncer) cuyo funcionamiento resulta difícil analizar en tumores humanos. En el ADN de las levaduras se han identificado genes estrechamente relacionados (lo que de por sí ya es un hallazgo importante, pues indica que los genes desempeñan papeles esenciales en la fisiología celular desde antes de la aparición de los organismos pluricelulares). La relativa simplicidad de la célula de levadura y las limpias manipulaciones a que puede someterse permiten realizar experimentos que quedarían fuera de nuestro alcance si se trabajara con células de mamífero. Los experimentos han proporcionado, en primer lugar, información sobre cómo funcionan los oncogenes; la extrapolación de los resultados a células de mamífero contribuirá a un rápido avance del conocimiento de las bases moleculares del cáncer.

La aplicación de las técnicas de clonación al estudio de la evolución incide también en el conocimiento de la especie humana. Al igual que las demás, nuestra especie consta de un grupo de organismos genéticamente heterogéneos. La diversidad proporciona las semillas de la futura evolución, y determinadas versiones de los genes, transportadas por algunos individuos, conferirán ciertas ventajas al género humano en futuros enfrentamientos con las fuerzas de la selección natural. Otras versiones de algunos genes presentes en el acervo génico del hombre son claramente desfavorables: los que predisponen a la anemia falciforme, aterosclerosis, cáncer, hemofilia y otros trastornos metabólicos. Estamos ya asistiendo a la identificación y clonación, rápidas, de los genes implicados en dichas enfermedades, con lo que se amplía la perspectiva de un diagnóstico claro de la predisposición genética en los adultos e incluso en el embrión.

El reconocimiento de la diversidad



9. CLONACION DE UN GEN: es la operación central de la técnica de la recombinación del ADN. En la figura se muestra un diagrama del método de trabajo. El ADN del genoma de un mamífero (*1*) se fragmenta con una enzima de restricción. Algunos de los fragmentos resultantes (*2, 3*) incluirán el gen deseado (*color*). Con la misma enzima se cortan múltiples copias de un plásmido vector (*4*). Plásmidos y fragmentos del genoma se mezclan y unen mediante ADN ligasa (*5*), introduciendo en bacterias los plásmidos híbridos así obtenidos (*6*). Las bacterias se traspasan a placas de cultivo, de suerte que de cada bacteria resulte una colonia, que será un clon puro cuyos miembros descienden de una misma célula (*7*). Las células de algunos clones podrían contener un plásmido recombinante que portara el gen buscado. Hay un sistema fácil de localizar el clon deseado en caso de que se haya identificado el ARNm del gen buscado y se pueda utilizar de sonda. Se transfiere a un disco de papel de filtro una muestra de las colonias; se rompen las células para exponer el ADN (*8*); se añade el ARN sonda, marcado con un isótopo radiactivo (*9*); éste se aparea sólo con el ADN buscado; se retira el resto de ARN no apareado (*10*). Al cubrir el papel de filtro con una emulsión, la muestra radiactiva produce una mancha en ésta (*11*), identificando así el clon que nos interesa (*12*).



10. GENEALOGIA que conduce hasta la técnica actual de la recombinación del ADN. El diagrama que la representa muestra cómo un amplio abanico de estudios y hallazgos han contribuido a una serie de nuevas técnicas, que a su vez implican nuevas posibilidades que abrieron nuevas áreas de investigación. El continuo desarrollo de nuevos métodos y el refinamiento alcanzado por las herramientas de trabajo han facilitado la evolución de la técnica recombinante.

en el acervo génico humano y de las lesiones del genoma ha estimulado la investigación acerca de las formas en que se podrían reparar los genes defectuosos, tanto en los individuos afectados como en su descendencia. Hoy en día, se dispone de técnicas que permiten introducir genes clonados en ciertos tejidos somáticos (no en la línea germinal), como la médula ósea o las células de la piel. Los genes clonados pueden ser las versiones favorables intactas de los genes que en el paciente se hallan sólo en forma defectuosa. La transferencia génica a células somáticas puede provocar la reversión, al menos en parte, de los efectos de ciertas lesiones genéticas. También la implantación de genes clonados en las células de la línea germinal humana podrá efectuarse en esta década; en ello radica la esperanza de curar defectos congénitos en los descendientes de los individuos afectados.

Las perspectivas de este tipo de terapéutica han suscitado un acalorado debate. Dos son los problemas fundamentales. Concierne el primero a la propia línea germinal humana. ¿Hasta qué punto la manipulación genética supone el cruce de una frontera inviolable? ¿Debería rodearse la línea germinal humana de una barrera que protegiera su integridad? Los intentos iniciales de mejorar unas condiciones, obviamente desfavorables, ¿no se verán reemplazados por planes más ambiciosos de "mejorar" la especie humana? Probablemente en la próxima década se identificarán los genes que inciden en la inteligencia y en la disposición y estructura corporal, con lo que dichos planes podrían ser cada vez más tentadores.

El segundo problema va más allá de la condición humana. ¿Se puede considerar a la manipulación genética una amenaza? Tal y como hemos descrito antes, se provocan alteraciones genómicas en bacterias, moscas, plantas y mamíferos. ¿En qué forma la presencia de organismos con genes alterados en su línea germinal altera las interrelaciones ecológicas ya existentes? Hasta el momento, los resultados obtenidos son tranquilizadores, ya que los individuos alterados genéticamente han demostrado ser menos viables que sus contrapartidas naturales, lo que hace que los ecosistemas no sufran ningún descalabro. Se podría aducir múltiples argumentos que justifiquen la elevada improbabilidad de un desequilibrio ecológico, pero ninguno de ellos proporciona la total seguridad de la imposibilidad de accidentes.

Una profunda inquietud subyace bajo la exposición de estos problemas. Tal y como hicieran los físicos 40 años atrás, los biológos han invadido el campo de la inocencia humana. ¿Podemos remodelar la vida en función de las necesidades y la curiosidad del hombre? ¿Se puede —y se debe— describir la vida en términos de moléculas? Para muchos, dicha descripción parece afear la belleza de la naturaleza. Para algunos de nosotros, en cambio, la belleza y el encanto de la naturaleza en ninguna parte se manifiestan con el esplendor que reluce en el orden submicroscópico descrito en las páginas de este número.

ADN

La doble hélice del material genético, molécula fundamental de la vida, es variable y flexible. En la expresión de su mensaje hereditario interactúa con proteínas reguladoras y otras moléculas

Gary Felsenfeld

La doble hélice de ADN constituye el símbolo más familiar de la revolución biológica que se inició en 1940. El modelo de la molécula de ADN, propuesto por James Watson y Francis Crick en 1953, provocó un impacto particularmente intenso al presentar su propia estructura indicios de cómo podría el ADN desempeñar sus funciones de almacenamiento y transmisión de la información genética. Gran parte del espectacular avance registrado en biología molecular a raíz de dicho hallazgo se ha concentrado en elucidar cómo interactúa el ADN con los restantes componentes de la célula viva para expresar la información que posee codificada. Varios descubrimientos recientes en esa área de investigación han revelado que, aun pareciendo el ADN en su habitual forma bihelicoidal sensiblemente inerte e inflexible, constituye en realidad, tanto química como estructuralmente, una de las moléculas más versátiles. En efecto, debe serlo para poder desempeñar sus múltiples funciones.

El exterior de la doble hélice del ADN (llamada a menudo dúplex) está dominado por los armazones de las dos hebras entrelazadas. Cada hebra, un largo polímero de subunidades llamadas nucleótidos, posee un esqueleto donde alternan grupos fosfato con un azúcar, la desoxirribosa, formando una cadena unida por enlaces covalentes: una estructura de gran cohesión, merced a que sus átomos comparten pares de electrones. Las cadenas exhiben polaridad, o dirección: presentan paralelismo en el dúplex, aunque con sentidos opuestos, y con paso de rosca dextrógiro.

Al anillo de azúcar de cada nucleótido se une una base: adenina (*A*), guanina (*G*), timina (*T*) o citosina (*C*). (La adenina y la guanina se denominan purinas; la timina y citosina son pirimidinas.) La ordenación de las bases nucleotídicas a lo largo de las cadenas determina la información que especifica la composición de todas las moléculas proteicas de un organismo.

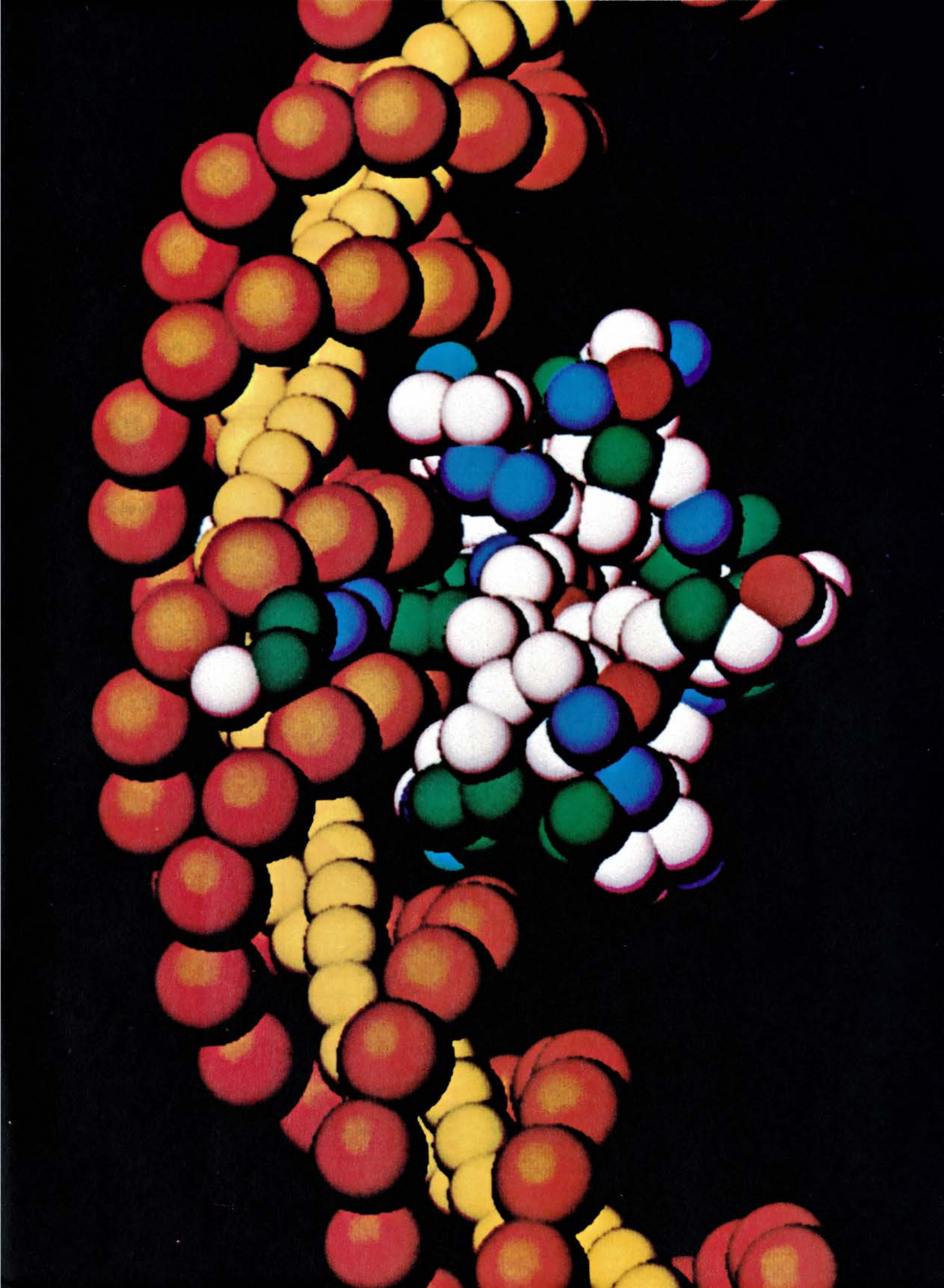
Las bases sobresalen del armazón azúcar-fosfato proyectándose hacia el centro de la estructura. Cada base se halla unida a otra base de la hebra opuesta mediante dos o tres enlaces de hidrógeno. Dada la estructura y tamaño de las bases, tal distribución exige que una *A* de una hebra se aparee con una *T* de la otra, y que la *G* se aparee con la *C*. De esa forma, la secuencia nucleotídica de una hebra determina la de la otra.

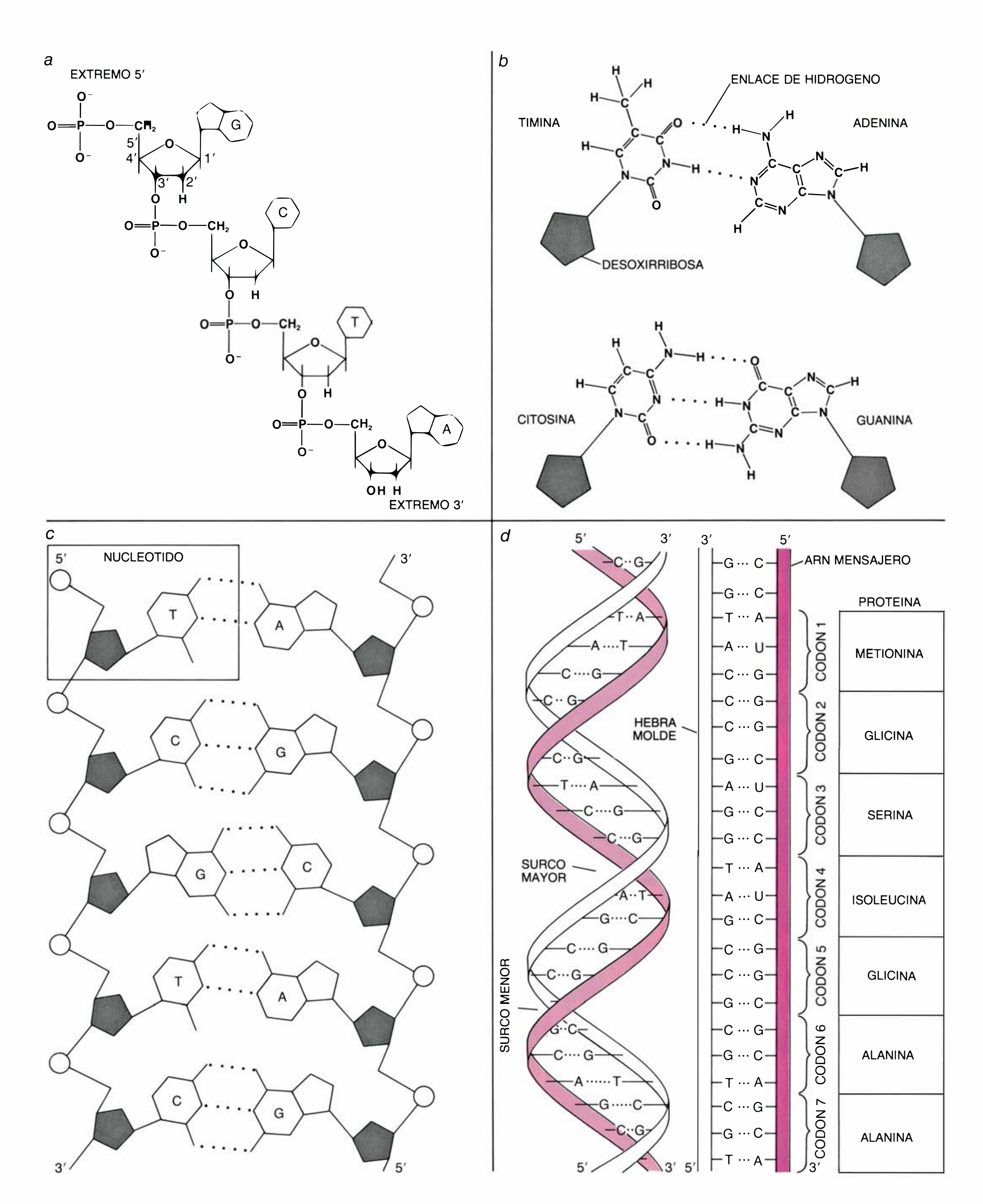
Al contemplar el modelo de Watson y Crick, se hace difícil imaginarse la estructura como una molécula capaz de reacción alguna. La mutua superposición de los pares de bases planares confiere cierta rigidez a la doble hélice. La disposición de las bases (los elementos variables) hacia el interior sugiere una estructura destinada a proteger el código genético más que a participar en reacciones bioquímicas. Tal apariencia es ilusoria: la doble hélice es capaz de adoptar muchas formas y de reaccionar de manera diversa con otras moléculas de la célula. Esas características las aprovechan las células para controlar la expresión de la información genética contenida en el ADN.

Ya en tiempos del descubrimiento de Watson y Crick se dedujo, a partir de los análisis por difracción de rayos X de fibras de ADN, que éste podía presentarse, como mínimo, de dos formas: la *B* (la forma descubierta por Watson y Crick) y la *A*, en la que los pares de bases presentan una inclinación distinta y están desplazados hacia el exterior respecto del eje de la hélice. En los últimos años se ha comprobado que las formas *A* y *B* detectadas por el análisis de fibras constituyen estructuras promediadas, o aproximadas. Estudios detallados de rayos X sobre ADN cristalino con secuencias de bases definidas han evidenciado que, dentro de la "familia *B*", por ejemplo, existe una sensible variabilidad de conformación local, dependiente de la secuencia. Otros estudios sobre fragmentos de ADN en disolución sugieren que determinadas secuencias nucleotídicas son capaces de inducir una curvatura permanente en el dúplex. Toda secuencia de ADN resulta, por tanto, reconocible desde el exterior del dúplex no sólo por sus bases, sino también por la variación de los detalles de la posición de las bases y de su armazón.

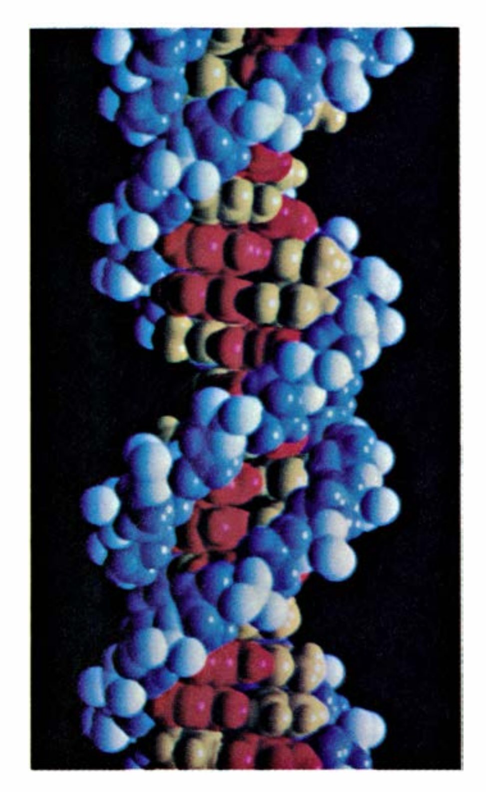
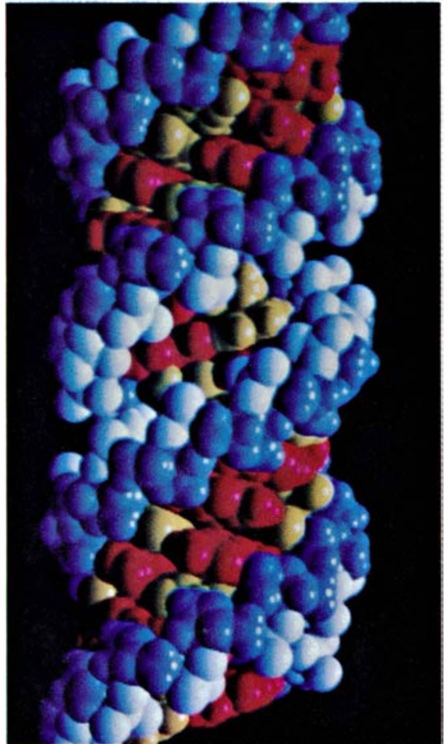
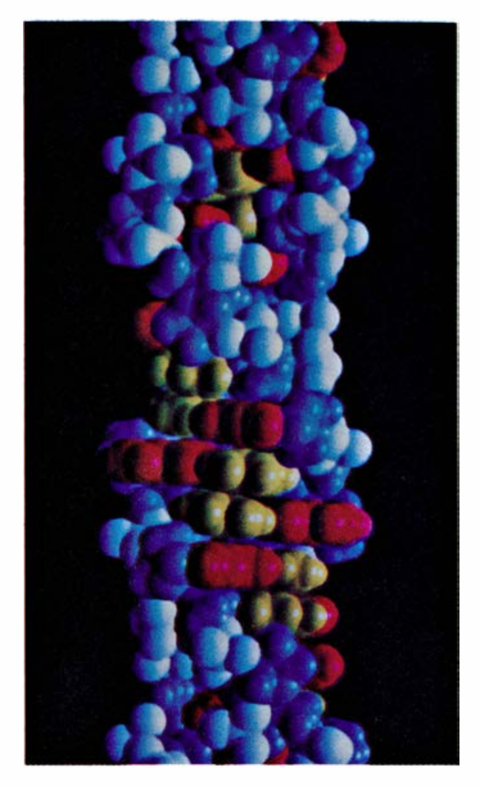
Se han observado secuencias de ADN más inusuales. Ciertas secuencias alternantes de purinas y pirimidinas son susceptibles de experimentar una conversión de hélice *B* dextrógira normal en la forma *Z*, levógira, cuya identificación se debe a Alexander Rich, del Instituto de Tecnología de Massachusetts, y sus colegas. El esqueleto del ADN *Z* sigue un trazado más irregular que el de la forma *B*, y los dos surcos (mayor y menor) que discurren a lo largo de los flancos de la hélice *B* se remplazan por un único surco menor, más profundo; los átomos que determinan el surco mayor del ADN *B* se

1. MOLECULA REGULADORA actuando sobre el ADN del bacteriófago lambda. Se trata del represor *cro*, la estructura de naturaleza proteica que aparece a la derecha de la imagen de la página opuesta, ligeramente separada de la representación de la doble hélice de ADN, situado más a la izquierda. Cada aminoácido del represor se representa por medio de una esfera: rojo para las cargas positivas, azul para las negativas, blanco para las hidrófobas y verde para las hidrófilas. En el ADN, las esferas naranja corresponden a componentes del esqueleto de azúcar-fosfato de la hélice; las esferas amarillas siguen el fondo del "surco mayor" de la hélice. El represor, que mediante una compleja reacción impide la expresión del gen, está a punto de penetrar en el surco mayor, donde sus cadenas aminoacídicas laterales establecerán enlaces de hidrógeno con las bases apropiadas del ADN. Este engarce explica la especificidad de la reacción. La imagen, generada por ordenador, se debe a B. W. Matthews y D. H. Ohlendorf, de la Universidad de Oregon.





2. ESTRUCTURA del ADN. Posee un armazón (*a*) constituido por la unión de grupos de azúcar y fosfato; a cada azúcar, a su vez, se enlaza una base: guanina (*G*), citosina (*C*), timina (*T*) o adenina (*A*). El grupo fosfato corresponde a las estructuras que llevan una *P* en el centro; el azúcar, al pentágono con un átomo de oxígeno (*O*) en el vértice superior. Cada grupo fosfato conecta el átomo de carbono 5′ de un azúcar con el átomo de carbono 3′ del adyacente. La combinación de azúcar-grupo fosfato-base constituye un nucleótido. (Las distancias entre átomos no aparecen a escala.) La naturaleza de los enlaces de hidrógeno que se establecen entre las bases es tal que la timina se aparea siempre con la adenina y, la citosina, lo hace con la guanina (*b*). La estructura resultante se muestra en dos dimensiones (*c*) y en tres: la doble hélice (*d*). Al transmitir el mensaje genético del ADN, la secuencia codificadora (*color*) se transcribe a una hebra de ARN mensajero, a partir de la cual se elaboran proteínas. La *U* de la hebra de ARNm corresponde al uracilo, homónimo de la timina en el ARN.

3. FORMAS ESTRUCTURALES del ADN: *B, A* y *Z*. En estas imágenes, generadas mediante ordenador por Richard J. Feldmann, de los Institutos Nacionales de la Salud, el armazón de azúcar-fosfato aparece en blanco (fosfato) y en gris azulado (el azúcar desoxirribosa). En el interior de la estructura, las pirimidinas, timina y citosina (*amarillo*), de una hebra se aparean respectivamente con las purinas, adenina o guanina (*rojo*), de la otra. La forma *B* del ADN (*izquierda*) es una hélice dextrógira que contiene alrededor de 10 pares de bases por vuelta. La forma *A* del ADN (*centro*) es también dextrógira, si bien las bases se hallan desplazadas del eje de la hélice y están inclinadas respecto de ese eje. La forma *Z* del ADN, recientemente descubierta, es una hélice levógira con un armazón en zig-zag, que da nombre a la estructura. La forma *Z* posee 12 pares de bases por giro helicoidal. (*A* y *B* son, en realidad, estructuras promediadas.)

desplazan hacia la superficie del dúplex de tipo *Z*.

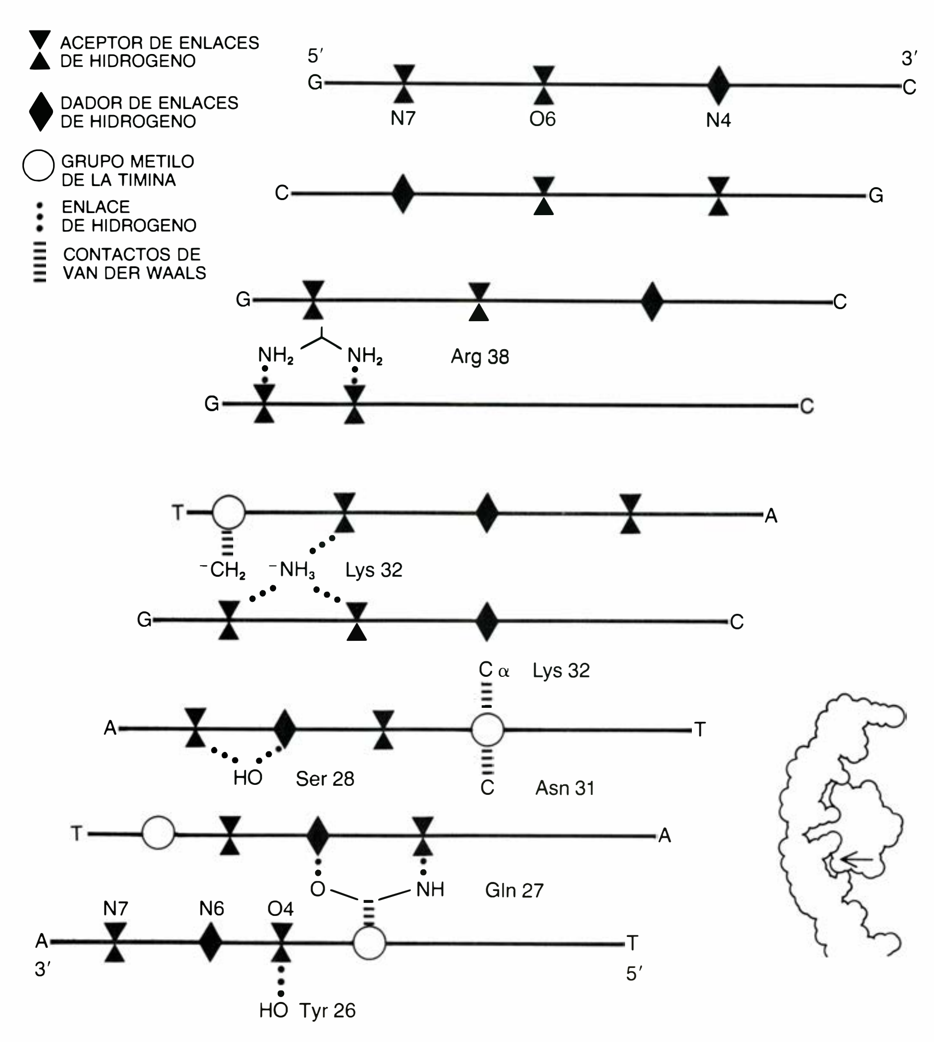
También son capaces de adoptar conformaciones específicas otras secuencias especiales del ADN. Una es la secuencia repetitiva recíproca, en la que a una secuencia dada de bases de una hebra le sigue su secuencia complementaria en orden inverso. Si las hebras de la doble hélice están separadas, puede formarse en cada una una estructura local de bases apareadas parecida a una horquilla. (Dada la complementariedad de las hebras, la existencia de una secuencia repetitiva recíproca en una hebra implica que se dé la misma circunstancia en la otra.) La estructura entera adopta un aspecto cruciforme. Puesto que la formación de ADN *Z* y de las formas cruciformes requieren el desenrollamiento del ADN *B*, cualquier tensión sobre la molécula de ADN que tienda a privilegiarla favorecerá también la aparición de esas estructuras poco comunes. Se ha sugerido que tales estructuras pudieran servir de señales de reconocimiento, importantes para el cometido biológico del ADN.

El ADN actúa como fuente de información genética mediante su interacción con proteínas que lo copian en una hebra de un ácido nucleico semejante, el ARN, y con otras proteínas que modulan la actividad copiadora. En el proceso denominado de transcripción, una clase de complejas enzimas, las ARN-polimerasas, elaboran una copia en ARN a partir de la secuencia de ADN de una de las hebras (la hebra codificadora). Parte del ARN desempeña por sí mismo un cometido estructural, si bien una gran proporción se convierte en ARN mensajero (ARNm), que dirige la síntesis de todas las proteínas celulares. En cualquier tipo de célula debe decidirse qué genes deben expresarse (transcribirse a ARN para su subsiguiente traducción a proteína) y en qué momento. La mayor parte de ese control se ejerce en la fase de engarce de la ARN-polimerasa.

La polimerasa inicia su acoplamiento a secuencias nucleotídicas específicas que preceden al inicio de cada gen, o agrupamiento de genes, a copiar; la región que definen se denomina "promotor". (La polimerasa "lee" el gen empezando por el extremo designado 5′ y procede hacia el otro extremo, el 3′.) De inmediato se plantean dos cuestiones. ¿Cómo puede regularse la fuerza de unión de la polimerasa? ¿Cómo distingue una proteína como la polimerasa las secuencias génicas específicas?

Cabe imaginar algunos mecanismos generales para la unión de la polimerasa. Podría inhibirse si el lugar de engarce apareciera bloqueado por otra proteína, o bien si se alterara la conformación local del ADN. Por otra parte, favorecerían el enlace de la polimerasa diversos tipos de cambios de la estructura del ADN, así como la unión de proteínas reguladoras suficientemente cercanas para interactuar favorablemente con la polimerasa y estabilizar el engarce al sitio de iniciación. Los organismos recurren a todas esas estrategias para controlar la expresión de sus genes. Los mecanismos de regulación precisan de muchas clases de secuencias nucleotídicas especiales y de gran número de proteínas para reconocerlas.

La información más detallada relativa a los procesos reguladores procede del estudio de bacterias y virus. En un esquema apoyado en ese tipo de investigación, la acción de la ARN-polimerasa parece modificarse por la unión al ADN de proteínas reguladoras especializadas cerca del lugar de engarce inicial de la polimerasa.



4. DIAGRAMA DE LA UNION entre el represor *cro* del virus lambda y su diana de ADN, según Matthews y colaboradores. En esta perspectiva, el observador contempla el surco mayor del ADN desde la mitad inferior de la proteína represora; la perspectiva se muestra en el diagrama (*derecha*), que corresponde a la imagen de la figura 1. Aparecen nueve pares de bases del ADN, empezando por la parte superior con *GC*. Los símbolos (*izquierda*) indican la naturaleza de los enlaces. También se muestran aquellos grupos de aminoácidos del represor que, según se cree, establecen contactos específicos con la base adyacente; por ejemplo, *Arg 38* indica una arginina situada en posición 38 a partir del extremo amino de la proteína represora. La sección helicoidal superior del represor se engarza de manera similar. (Dibujos de George V. Kelvin.)

El ejemplo clásico de dicho mecanismo lo constituye el operón *lac* de la bacteria *Escherichia coli*. Se trata de una agrupación de genes asociados al metabolismo del azúcar lactosa; el primero de dichos genes codifica la enzima beta-galactosidasa, que descompone la lactosa en dos azúcares menores. El régimen de síntesis de la enzima depende directamente de la cantidad de lactosa que haya en la célula: cuanto mayor es la cantidad de lactosa, mayor el nivel de producción de la enzima.

El agente regulador responsable de ese comportamiento es una molécula proteica, el represor *lac*, capaz de sujetarse fuertemente a una secuencia de nucleótidos (el denominado operador) situada entre el punto de unión de la ARN-polimerasa (el promotor) y la región que determina la beta-galactosidasa. En ausencia de lactosa, el represor aparece unido al operador, con el consiguiente bloqueo de la unión de la polimerasa. El represor es capaz también de formar un complejo con un derivado de la lactosa, que actúa de "inductor", pues se une a la región del operador mucho más débilmente. Ante un exceso de lactosa se forma el complejo, se desprende el represor del ADN, se une inmediatamente la polimerasa al promotor y se induce la transcripción del gen.

La unión de la proteína represora al lugar específico del ADN es extremadamente enérgica. También es selectiva: la constante de equilibrio en condiciones fisiológicas (una medida del grado de unión) es aproximadamente mil millones de veces mayor para la unión al operador que para el engarce en una secuencia convencional de ADN de cualquier otro punto del genoma. A pesar de ello, la constante de equilibrio para la unión al azar es lo suficientemente elevada para garantizar que las moléculas de represor sobrantes se unan a algún punto del ADN.

Esta unión inespecífica desempeña también un importante cometido en el proceso regulador. Como han observado Peter H. von Hippel y sus colegas, de la Universidad de Oregon, actúa de competidor, manteniendo la unión específica del represor (al operador *lac*) dentro de ciertos límites, para que pueda invertirse cuando la situación reclame nueva producción de beta-galactosidasa. La formación del complejo con ADN inespecífico también repercute sensiblemente sobre el régimen de ensamblaje del complejo específico operador-represor, ya que el represor, una vez engarzado a cualquier parte de la molécula de ADN del cromosoma bacteriano, muestra una probabilidad mucho mayor de coincidir con la región del operador. Von Hippel ha demostrado que, por lo general, el represor *lac* localiza al operador deslizándose a lo largo del ADN.

La proteína del represor queda retenida en el ADN principalmente por fuerzas electrostáticas y por enlaces de hidrógeno. Las fuerzas electrostáticas requieren la interacción entre los aminoácidos de la proteína cargados positivamente y las cargas negativas del armazón del ADN. Aunque esas fuerzas contribuyen significativamente a la de unión, por naturaleza son sensiblemente inespecíficas. La especificidad que permite al represor reconocer de forma preferente la secuencia nucleotídica singular que define el operador procede, esencialmente, de la formación de enlaces de hidrógeno específicos. Estos unen un conjunto definido de cadenas aminoacídicas laterales de la proteína con el correspondiente conjunto de dadores y aceptores de enlaces hidrógeno de las bases nucleotídicas del operador.

Aunque no se ha desentrañado aún la estructura completa del represor *lac*, sí se ha recabado importante información de los estudios de difracción de rayos X de proteínas represoras comparables. Una de esas estructuras, establecida en el laboratorio de Brian W. Matthews, de la Universidad de Oregon, es el represor *cro* del bacteriófago lambda. Participa en un proceso regulador parecido al del represor *lac*, aunque de mayor complejidad. La proteína *cro* posee segmentos de hélice alfa colocados de tal manera que en-

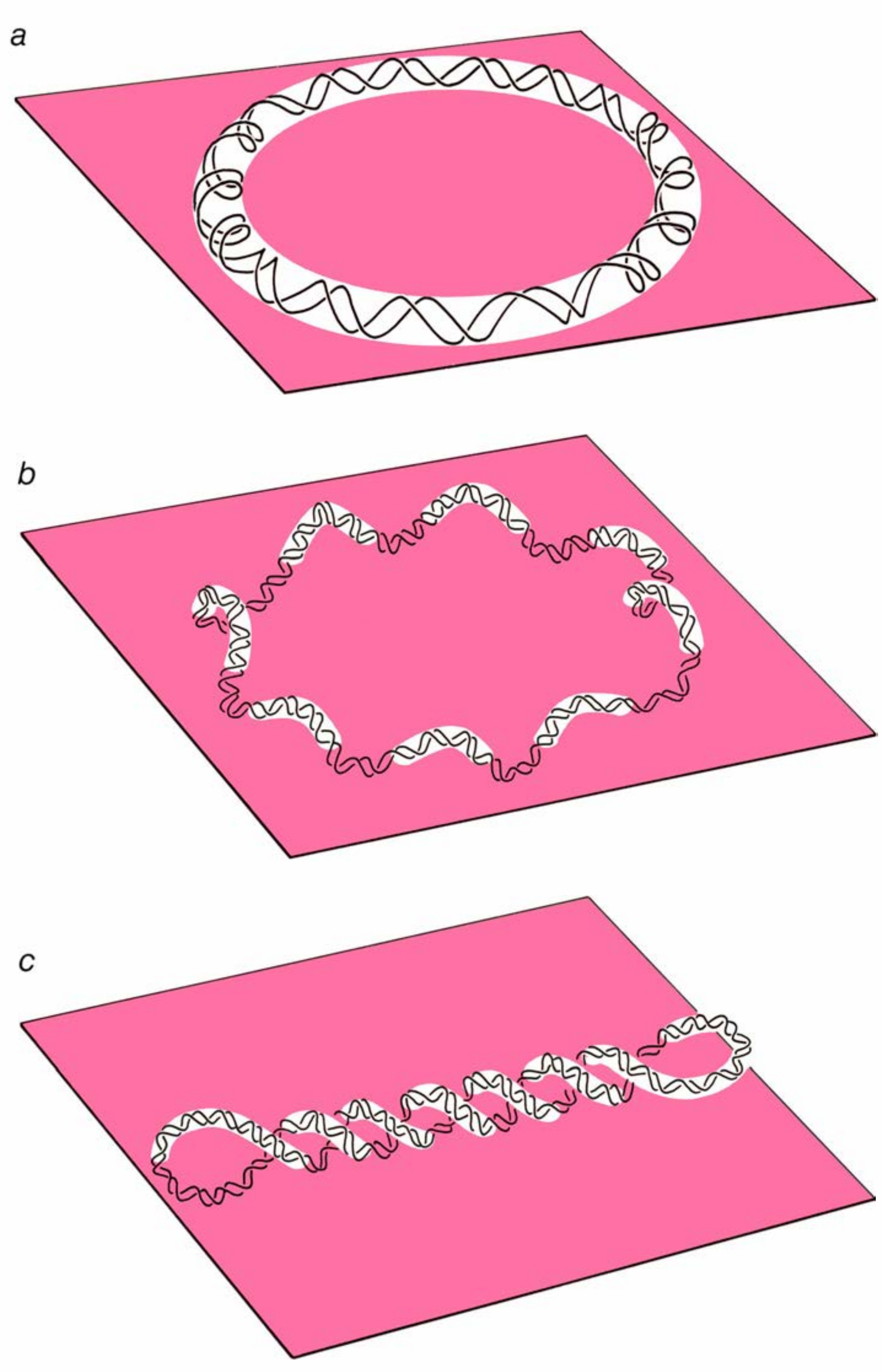
cajan en el surco mayor del dúplex de ADN y establecen los contactos por enlaces de hidrógeno apropiados [*véase la figura 1*]. Según afirma Matthews, esa distribución de hélices alfa la comparten un significativo número de proteínas reguladoras de virus y bacterias. La especificidad mostrada por cada proteína para una secuencia particular de bases depende del conjunto de aminoácidos que ocupen las posiciones de enlace por hidrógeno. Aunque la estructura de otras proteínas con afinidad por el ADN, en virtud de la especificidad de secuencia, difiere considerablemente, los principios básicos de reconocimiento probablemente sean comunes.

¿Cómo encaja la diversidad de conformaciones del ADN con ese tipo de interacciones? El ADN, en sus diversas formas, exhibe manifiestas desviaciones puntuales de estructura, dependientes de detalles de la secuencia nucleotídica. Probablemente las proteínas que reconocen una determinada distribución de uniones por hidrógeno en un surco dado de la doble hélice tengan en cuenta hasta cierto punto esas peculiaridades locales de estructura a la hora de ubicar sus propios grupos reactivos. Cabe también, dada la plasticidad estructural del ADN, que éste se deforme en cierto grado para acomodar la proteína. La estructuración final será un compromiso con la magnitud de las fuerzas necesarias para alterar la forma del dúplex.

En los casos de los represores *lac* y *cro*, las respuestas a esas cuestiones dependen de los estudios de difracción de rayos X de los complejos que forman la proteína y su objetivo en el ADN. Sin embargo, estudios sobre otras proteínas han puesto ya de manifiesto que en ciertos casos la doble hélice puede alterarse bastante. El operón *lac* y otra proteína reguladora, denominada CAP (proteína activadora de catabolitos), forman un complejo distorsionado de ese tipo.

La CAP es una proteína que estimula la transcripción de numerosos genes en respuesta al incremento de la concentración de una pequeña molécula efectora, el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc). Cuando el AMP cíclico se une a la CAP, el complejo puede unirse al ADN. En el caso del operón *lac*, el punto de engarce se halla contiguo (hacia el extremo terminal 5′) al lugar de unión de la ARN-polimerasa. La conformación de ese complejo en disolución la ha estudiado Donald M. Crothers, de la Universidad de Yale. Ha observado que, si bien el ADN del *lac* se encuentra estirado en ausencia de proteína, la unión con la CAP provoca una curvatura que determina una migración electroforética anómala en geles. (Esta técnica de "tamizado" consiste en la migración de moléculas bajo la influencia de un campo eléctrico a través de una matriz porosa; se provoca con ello la separación de las mismas según su tamaño y forma.) Crothers sugiere que la curvatura quizá sirva para facilitar el contacto directo de la CAP con la polimerasa adyacente, y así transmitir la señal estimuladora.

Otra destacada forma de participación de la estructura del ADN en la regulación de la transcripción se pro-



5. SUPERENROLLAMIENTO DEL ADN, que modifica la forma y la estabilidad de la doble hélice. Si empalmamos los extremos de la hélice, transformándola en un anillo (*a*), queda reposando sobre el plano, dada la relajación del ADN. Si la doble hélice se desenrolla parcialmente antes de unir sus extremos (*b*), tiende a recuperar su trenzado normal, con lo que el armazón deja de yacer en el plano. Se convierte entonces en una superhélice levógira toroidal. Una forma topológicamente equivalente (*c*) es una superhélice dextrógira, que probablemente se asemeja a la forma que adopta ese ácido nucleico superenrollado en la célula viva.

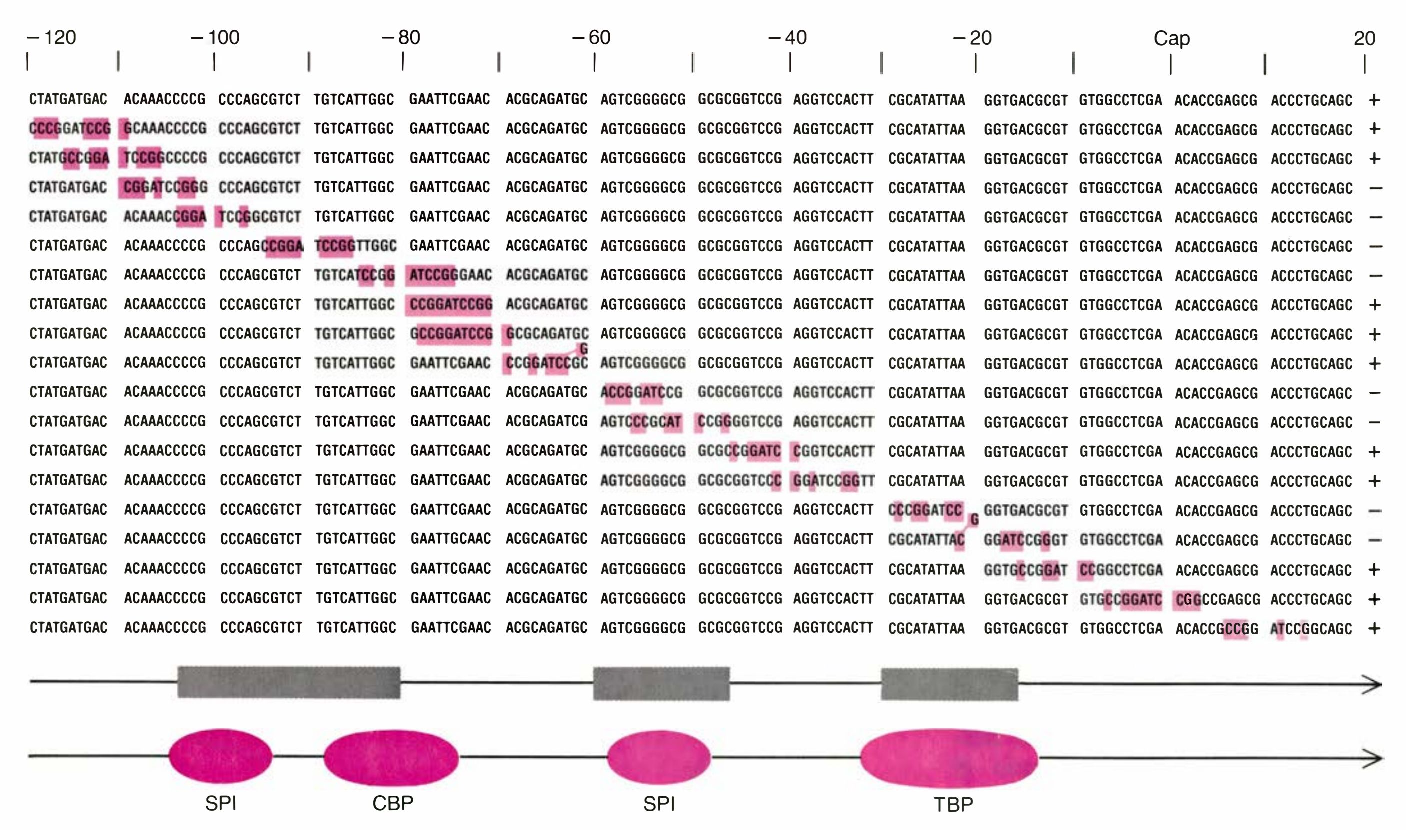
duce mediante el fenómeno denominado superenrollamiento. Imagínese un procedimiento de laboratorio por el cual se dobla un segmento lineal de ADN, que permanece plano sobre una superficie, hasta que sus extremos opuestos se tocan y permiten la unión covalente de las hebras en un anillo. Antes de sellar los extremos, el experimentador destrenza ligeramente las dos hebras de ADN a fin de que, después de unirlas, exista una fuerza motriz que tienda a restablecer el trenzado normal. Debido a constricciones topológicas, sin embargo, cualquier intento de restablecer el enrollamiento normal debe ir acompañado de una distorsión que evite que el esqueleto del ADN quede en el plano. El ADN se halla ahora superenrollado, esto es, la propia doble hélice sigue un trazado superhelicoidal. Las estructuras resultantes del desenrollamiento del dúplex de ADN previo a su circularización se consideran superenrolladas negativamente.

El ADN superenrollado no constituye una mera curiosidad de laboratorio; es la forma común de la mayor parte del ADN en las células vivas. Según demostraron hace pocos años Abraham Worcel, actualmente en la Universidad de Rochester, y David E. Pettijohn, del Hospital Clínico de la Universidad de Colorado en Denver, el ADN cromosómico de las bacterias está organizado en bucles, afianzados en sus bases por una combinación de ARN y proteína que sirve para aislar topológicamente cada bucle de sus vecinos, de modo que se comporte como un anillo que puede superenrollarse independientemente. Sin duda, el superenrollamiento debe ser importante para esas células, pues invierten una considerable energía en la generación de superenrollamientos negativos y en el mantenimiento de la proporción de superenrollamiento en un nivel relativamente constante.

La enzima a la que principalmente le corresponde esa función en las bacterias es la ADN-girasa, descubierta por Martin F. Gellert, del Instituto Nacional de la Artritis, Diabetes y Enfermedades Digestivas, y sus colegas, en 1976. La girasa es capaz de convertir una molécula circular, relajada y cerrada (o un bucle topológicamente aislado), en una forma superenrollada negativamente. Obtiene la energía necesaria para esa reacción de la hidrólisis del trifosfato de adenosina (ATP), la fuente energética más importante para las reacciones biológicas.

Gellert y sus colaboradores han explorado cómo modulan el nivel de superenrollamiento en *E. coli* la girasa y otras enzimas. El hallazgo más notable ha sido que el régimen de transcripción del gen de la girasa lo controla el propio nivel de superenrollamiento: la producción de girasa se suspende cuando el número medio de vueltas superhelicoidales negativas se incrementa. Estudios ulteriores han revelado que la transcripción de muchas proteínas bacterianas depende de la superhelicidad del ADN (aunque algunas de ellas se producen con un ritmo superior al aumentar el grado de superenrollamiento.)

¿A qué se debe que el superenrollamiento intervenga en la regulación de la transcripción? Se sabe, por multitud de estudios sobre el modo



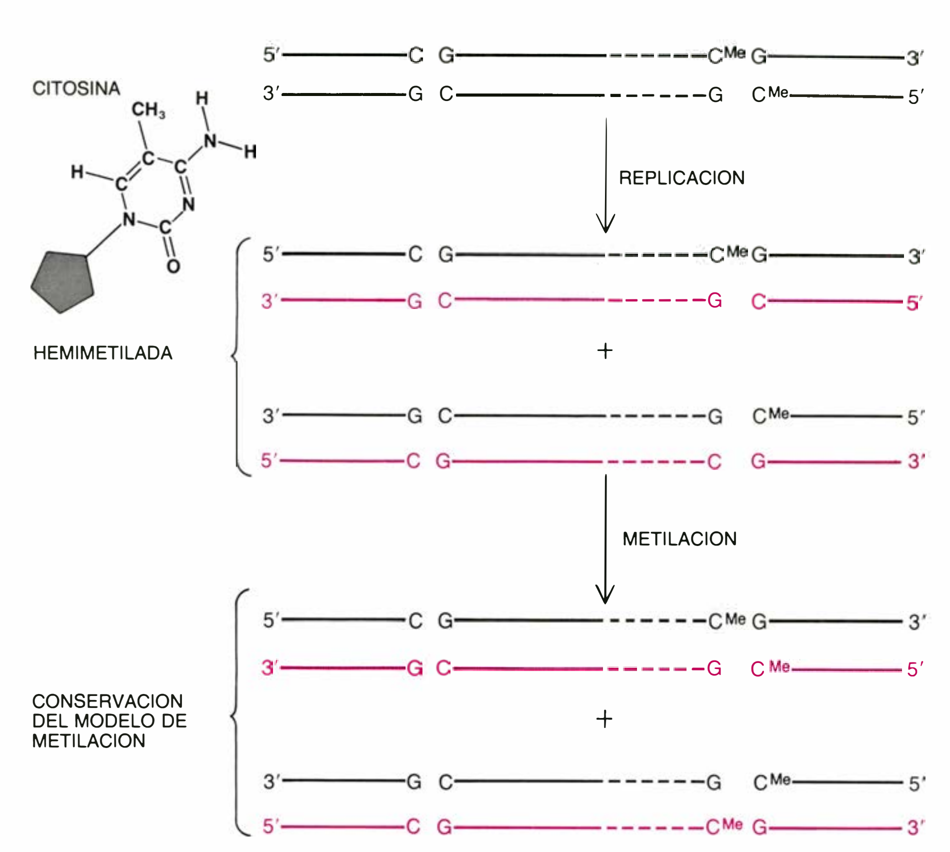
6. EXPERIMENTOS DE MODIFICACION GENICA de Steven McKnight, de la Institución Carnegie. Se efectuaron con el gen de la timidín quinasa (*tk*) del virus del *Herpes simplex*. El propósito era comprobar el efecto, sobre la expresión del gen, de las alteraciones provocadas en la región del promotor. En la línea superior se muestra la secuencia completa de bases del ADN de esa región. En cada línea inferior se señala la posición de las secuencias nucleotídicas alteradas por ingeniería genética (*color*). El signo (+) del final de la línea indica que la alteración tiene poco o nulo efecto sobre la expresión del gen; el signo (−) indica que la alteración reduce el nivel de síntesis de *tk*. Las tres regiones que, según los experimentos, resultaban importantes para la expresión se indican mediante bloques grises en la parte inferior del diagrama. Recientes trabajos realizados por McKnight, en colaboración con R. Tjian y K. Jones, de la Universidad de California en Berkeley, han logrado identificar los lugares de engarce de tres proteínas reguladoras: SP1, CBP y TBP (*línea inferior*). CBP y TBP reconocen, respectivamente, las secuencias reguladoras comunes *CAAT* (o *CATT*) y *TATA*, que asimismo corresponden a un grupo de secuencias similares.

de acción de la ARN-polimerasa, que la iniciación de la transcripción se produce en dos fases. En primer lugar, la polimerasa se une al promotor; a continuación, el dúplex experimenta una desnaturalización local, o "fusión", que separa las dos hebras de ADN, permitiendo el avance de la transcripción. La desnaturalización destrenza el ADN, aliviando, en consecuencia, la tensión superhelicoidal. Consideraciones energéticas, por consiguiente, sugieren que el aumento de la superhelicidad negativa debería favorecer la desnaturalización y, por tanto, el inicio de la transcripción. A pesar de que un modelo tan simple como el anterior no explica la regulación de la síntesis de la girasa, sí aclara los efectos del superenrollamiento en la expresión de otros genes bacterianos.

El superenrollamiento facilita a la célula un poderoso mecanismo para regular la transcripción, pues la tensión superhelicoidal global de un ADN anular o de un bucle puede alterarse por cualquier cambio puntual en la zona de influencia de dicha estructura. El superenrollamiento negativo no sólo favorece el destrenzado del dúplex de ADN, sino que también estabiliza la formación del ADN *Z* y de las estructuras cruciformes descritas al principio. Estas y otras deformaciones podrían resolver un problema biológico crucial: ¿Cómo consiguen comunicarse con el propio gen los elementos reguladores, irremediablemente alejados unos de otros a considerables distancias en el ADN lineal?

En ninguna parte resulta más acuciante esta cuestión que en el ADN de los organismos superiores. Una célula típica, animal o vegetal, contiene alrededor de 1000 veces más ADN que *E. coli*, y la expresión de ese ADN debe estar sujeta a controles mucho más complejos que los requeridos en un microorganismo. Una de las tareas esenciales de esos controles es garantizar que, en cada una de las células especializadas que conforman los tejidos diferenciados del organismo superior, sólo se activen aquellos genes que resultan esenciales para la función de dicho tipo celular. En una primera aproximación, la estrategia de control diseñada por las células eucariotas (nucleadas) es semejante a la de los microorganismos.

El gen de la timidín quinasa (*tk*) del virus del *Herpes simplex* constituye un ejemplo particularmente ilustrativo de la organización de secuencias reguladoras en los eucariotas. Para identificar



7. METILACION GENICA. La adición de un grupo metilo (CH_3) al quinto átomo del anillo de la citosina constituye un mecanismo de amortiguación de la expresión de los genes. En los organismos superiores, los sitios de metilación son las citosinas contiguas a una guanina en la misma hebra. El patrón de metilación se transmite al dividirse la célula. Se indican aquí las fases de la replicación. Las hebras de ADN de la parte superior poseen un par *CG* metilado (*Me*). Al sintetizarse ADN nuevo durante la división, las dos hebras de ADN se separan para que se obtengan dos filamentos complementarios nuevos (*color*). En ese proceso se incorpora *C* no metilada, de manera que las dobles hebras nuevas aparecen "hemimetiladas" en los sitios donde la metilación era antes completa. En la fase final, una enzima metilante actúa sobre el ADN, añadiendo grupos metilo a las bases *C* que se encuentran en oposición a una citosina ya metilada. Se perpetúa así el modelo original. El aumento de metilación tienden a correlacionarse con el descenso de la expresión génica.

los elementos de control del gen, primero debe aislarse, clonándose luego en un vector plasmídico. (Los plásmidos son pequeñas moléculas anulares de ADN. Dado que se multiplican de forma independiente en las bacterias, pueden obtenerse grandes cantidades de material homogéneo para su estudio.) Cabe, luego, analizar la expresión de un gen introduciendo el plásmido en una célula apropiada.

En experimentos realizados por Steven McKnight, de la Institución Carnegie del Departamento de Embriología de Washington, y Richard Axel, de la Universidad de Columbia, se inyectaron en ovocitos de la rana *Xenopus laevis* plásmidos portadores de *tk*. En el ovocito, el gen se transcribe directamente desde el plásmido, de manera que puede medirse la cantidad de ARN de *tk* producido.

En una segunda clase de ensayos se utiliza una poderosa técnica desarrollada con anterioridad por Axel y sus colaboradores. Un cultivo de células de ratón mutantes, carentes de su propio gen *tk*, se ve obligado a absorber el ADN vírico, que acaba integrándose en el complemento de ADN de la célula y expresándose. Si en ese instante se transfieren las células a un medio especial donde se requiere la timidín quinasa para sobrevivir, el nivel de expresión de la enzima vendrá establecido por el número de colonias celulares que crezcan.

Para proceder a la disección de la región de control del gen *tk*, que se encuentra en dirección 5′ de la secuencia codificadora del gen, es necesario combinar los anteriores ensayos con técnicas de ADN recombinante. Se reemplazan sistemáticamente porciones de la secuencia normal por segmentos equivalentes de ADN exógeno, empezando indistintamente por uno u otro extremo de la región génica. Al examinar el perfil de la expresión de esos genes mutados deliberadamente, se detectan las porciones que corresponden a cada segmento.

El primero, alrededor de 25 nucleó-

tidos por delante del lugar de inicio de la transcripción, parece afectar al lugar de partida de la síntesis de ARN: al alterar un segmento que contiene la secuencia *TATTAA*, el nivel de transcripción desciende y aparecen nuevas especies de ARNm cuyos lugares de iniciación se han desplazado respecto de los normales. (David S. Hogness y Michael Goldberg, de la Universidad de Stanford, fueron los primeros en señalar la dominancia de la secuencia *TATA* y de otras muy emparentadas en las regiones promotoras de los genes eucariotas. Su influencia sobre los lugares de iniciación de la transcripción se ha observado en muchos laboratorios y en multitud de genes.)

A medida que se desplaza el defecto de secuencia en dirección 5′, se tropieza con otro tipo de región de control, que influye sobre el nivel final de transcripción, pero no sobre el lugar de su origen. Al perturbarse esta secuencia, la producción de ARNm desciende aproximadamente diez veces. Otra secuencia sensiblemente homóloga, de propiedades semejantes, se localiza más lejos todavía. De ambos lugares, el más cercano al de partida de la transcripción parece decisivo para el control positivo de la transcripción.

Aunque la estrategia global adoptada por el gen *tk* de herpes para la regulación transcriptiva no difiere mucho de la que se observa en los microorganismos, los eucariotas han desarrollado una gran variedad de mecanismos de control. En uno de ellos participan elementos estimulantes, denominados potenciadores, identificados por primera vez en virus animales como el SV40.

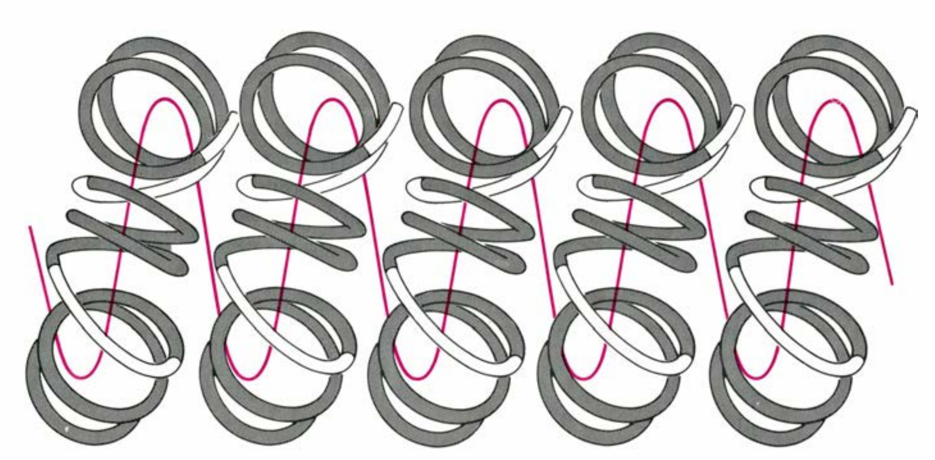
SV40 es un pequeño virus cuyo ADN circular sólo alcanza a codificar unas pocas proteínas. La transcripción se inicia en dos promotores adyacentes en el círculo, y prosigue en sentidos opuestos. El promotor "temprano", que actúa al principio del proceso infectivo, presenta alguno de los elementos del gen *tk* del herpes. Posee asimismo dos copias de una secuencia de 72 nucleótidos colocadas en tándem.

Pierre Chambon, de la Universidad de Estrasburgo, y George Khoury, del Instituto Nacional del Cáncer, con sus colaboradores, consiguieron demostrar, valiéndose del tipo de análisis de deleción descrito para el gen *tk*, que la ausencia de ambas copias de dicho elemento reducía en más de 100 veces la transcripción temprana del gen. Lo que distingue a ese elemento, que ha venido en llamarse potenciador, o exaltador (*enhancer*) de los otros tipos de elementos reguladores descritos es que su efecto estimulante no depende de ninguna disposición precisa respecto del sitio de iniciación de la transcripción. Walter Schaffner, de la Universidad de Zurich, y sus colegas recurrieron a la inserción del tándem repetido a distancias variables de un gen patrón. Advirtieron que aquel ejercía su influencia a distancias superiores a 3000 nucleótidos. (Las secuencias potenciadoras suelen estar, en las células, mucho más próximas de los genes que controlan.) Las secuencias potenciadoras ejercen su efecto aun insertándose en orientación inversa, según han puesto de manifiesto los trabajos realizados en el laboratorio de Chambon y en el de Paul Berg, de Stanford.

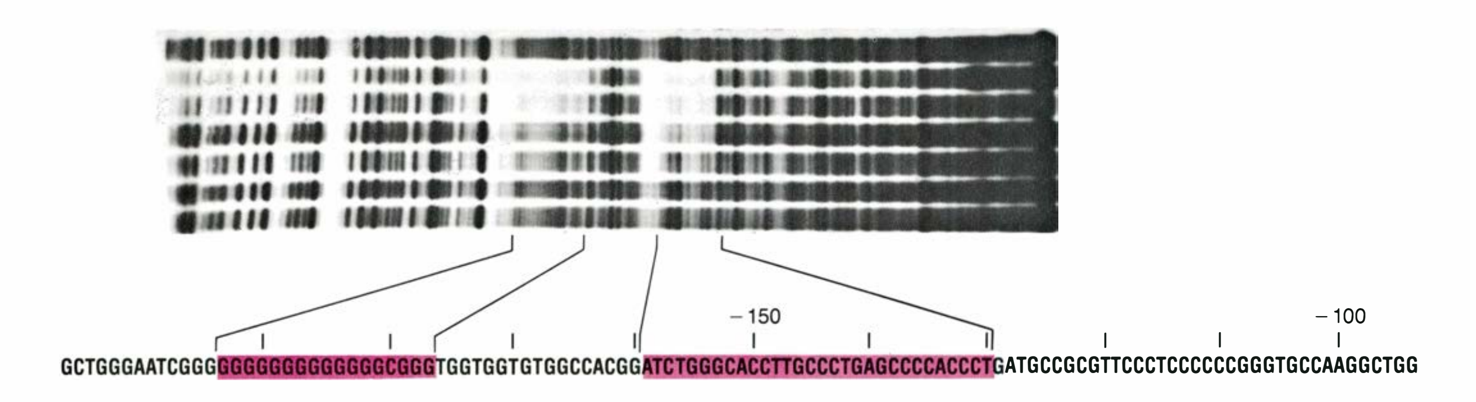
Esta característica (actuación independiente de la distancia y la orientación) es el atributo definitorio de los potenciadores, como subsiguientemente se ha puesto de manifiesto en muchos genomas víricos. Los potenciadores se hallan también presentes en los cromosomas eucariotas. Max Birnstiel y Rudolf Grosschedl, de la Universidad de Zurich, identificaron en 1980 una secuencia potenciadora en el erizo de mar cercana a los genes que determinan las proteínas denominadas histonas; más recientemente, esas secuencias se han localizado en asociación con los genes de las inmunoglobulinas (anticuerpos) y con otros genes eucariotas.

No está claro aún cómo actúan los elementos potenciadores, aunque es probable que su forma de operar implique el engarce de alguna proteína. Se detectó esa unión en los genes de las inmunoglobulinas; unión que acaba de lograrse en el laboratorio de Chambon con el segmento redundante de 72 nucleótidos del SV40. Ya que se produce una acción a distancia, se ha sugerido que la señal estimuladora quizá se transmita mediante modulaciones en el superenrollamiento del ADN. De acuerdo con otra hipótesis, el potenciador actúa como lugar de anclaje de la ARN-polimerasa, a partir del cual ésta se desplaza a lo largo del ADN hasta alcanzar el promotor. En cualquier caso, el aspecto más llamativo de recientes investigaciones es la demostración de que los potenciadores son específicos para cada tipo celular. Por tanto, parece probable que la molécula proteica específica, necesaria para la activación de un potenciador dado, se encuentre sólo en aquellas células que requieren la expresión de genes sometidos a control del potenciador.

Otra estrategia reguladora que emplean algunos eucariotas es la modificación de su ADN mediante la adición de un grupo metilo (CH_3) en la posición del carbono 5 de la citosina. Las dianas de metilación en los organismos



8. EMPAQUETAMIENTO del ADN en las células eucariotas. Permite que en el interior del núcleo celular se acumulen grandes cantidades de ADN de manera ordenada, y asimismo proporciona un mecanismo por el cual ciertos fragmentos de la secuencia, muy separados entre sí, se aproximen y puedan interactuar con componentes reguladores. La forma compacta se denomina cromatina y, su unidad fundamental, nucleosoma. Aparecen rosarios de nucleosomas que, por plegamiento, constituyen fibras de 30 nanómetros de grosor. Se muestra aquí el modelo propuesto para el empaquetamiento de los nucleosomas en fibras de 30 nanómetros en los eritrocitos de pollo, concentrándose en el cromatosoma, la porción central del nucleosoma. En el cromatosoma, dos vueltas de la doble hélice de ADN (*gris*), cada una de una longitud aproximada de 83 pares de bases, se enrollan en superhélices alrededor de un complejo de ocho moléculas proteicas denominadas histonas (que no se muestran aquí). En la fibra, los cromatosomas, unidos por ADN de conexión (*blanco*), aparecen enrollados en una disposición solenoidal (*su trayectoria la traza la línea de color*), presentándose una media de seis cromatosomas por vuelta de solenoide. La orientación de los cromatosomas se deduce de estudios ópticos de fibras alineadas eléctricamente. El trazado de los conectores en esta representación es hipotético. Por mor de claridad sólo se muestran los tres nucleosomas frontales de cada vuelta.



9. ESTRUCTURA DE LA CROMATINA cerca del promotor de un gen activo: el gen de la beta-globina adulta del eritrocito de pollo. La secuencia empieza en la parte inferior derecha, justo antes del inicio de la transcripción, en la posición +1. En las células cuyo gen de la globina se encuentra inactivo, toda la región aparece cubierta de nucleosomas, mientras que en los eritrocitos donde se expresa el gen se encuentra a faltar un nucleosoma. Experimentos realizados por Beverly M. Emerson demuestran que ciertos factores proteicos del núcleo celular pueden desplazar el nucleosoma, uniéndose fuertemente al ADN. Aquí se muestra el experimento de localización del lugar de unión. Al digerirse ligeramente con una nucleasa (enzima que secciona el ADN) una hebra de ADN marcada radiactivamente en un extremo, los sitios donde se engarza el factor aparecen protegidos del ataque. El autorradiograma (*arriba*) muestra la migración de fragmentos de ADN en un gel: se desplazan de derecha a izquierda. (Los fragmentos menores se mueven a velocidad superior.) La línea superior de la autorradiografía muestra el perfil de migración de ADN desnudo. Empezando por abajo, se añadieron cantidades crecientes de factor. Se indican dos regiones de protección (*color*). La de la izquierda contiene una larga cadena de pares *GC*, capaz de adoptar una estructura secundaria inusual. La región derecha posee una secuencia repetida invertida casi perfecta. La zona grisácea señala la posición aproximada del primer nucleosoma que sigue a la región sin nucleosomas.

superiores son, con carácter casi exclusivo, aquellas citosinas que van seguidas inmediatamente de guanina. No todos los lugares *CG* aparecen metilados; el modelo de metilación se hereda con estabilidad aceptable en cada tipo celular. El trabajo realizado en diversos laboratorios ha conseguido elucidar dicho modelo: la mayoría de genes que no se expresan tienden a presentar metilada una significativa proporción de sus sitios, mientras que, en otra célula en la que esos mismos genes se encuentren activos, se advierte una acentuada disminución de sus niveles de metilación, a menudo concentrada en su región promotora. Aunque no se comprende del todo el mecanismo que altera la metilación de forma tan específica, parece probable que el cambio sea hasta cierto punto responsable de facilitar la modificación de los niveles de transcripción.

Las pruebas en favor de ese cometido proceden de experimentos que demuestran que las regiones promotoras de ciertos genes pueden inactivarse mediante la metilación deliberada de sitios específicos. Aharon Razin y Howard Cedar, de la Universidad Hebrea de Jerusalén, y sus colegas han demostrado dicho efecto introduciendo en células de ratón ADN con un gen de hámster. Las células incorporaban el ADN y, en condiciones normales, se expresaba. Sin embargo, si se metilaba antes el ADN, el gen no se expresaba, aunque la incorporación procediera normalmente. Más aún, las generaciones celulares subsiguientes heredaban el gen metilado inactivo. Distintos experimentos, realizados por Walter Doerfler, de la Universidad de Colonia, y sus colegas, pusieron en evidencia el mismo efecto mediante la introducción de otro gen en los ovocitos de *Xenopus*. Recientes trabajos del grupo de Doerfler han demostrado que basta metilar unos pocos pares *CG* para abolir la actividad génica.

Poco se sabe de cómo opera la metilación. Probablemente, y al igual que las otras señales reguladoras discutidas, en última instancia ejerce su efecto alterando la interacción del ADN con sus proteínas afines.

Hemos descrito el genoma eucariota como si se tratara de ADN desnudo, presto a experimentar transiciones conformacionales, o bien a interactuar con proteínas reguladoras que consiguen penetrar en el núcleo. La situación real es considerablemente más complicada, dada la existencia de mecanismos de empaquetamiento del ADN propios de los eucariotas. Las considerables cantidades de ADN nuclear aparecen íntimamente asociadas, casi sin excepción, con proteínas denominadas histonas. Estas últimas envuelven el ADN, confiriéndole una forma compacta y ordenada conocida por cromatina.

La subunidad fundamental de la estructura cromatínica es el nucleosoma. Cada nucleosoma posee una parte central, el cromatosoma, en el cual se enrollan en superhélice, alrededor de un octámero de histonas (complejo octamolecular), dos vueltas de ADN bicatenario, cada una de unos 83 pares de bases de longitud. Los cromatosomas adyacentes se conectan mediante un segmento enlazante de ADN relativamente libre.

Tanto nucleosomas como cromatosomas pueden aislarse del núcleo de las células mediante digestión parcial con nucleasas, enzimas que seccionan preferentemente el ADN enlazante y, por consiguiente, rompen las conexiones entre las subunidades. Un producto de digestión particularmente estable es la partícula núcleo del nucleosoma, formada por un octámero más una vuelta y tres cuartos de ADN. El problema de la compactación queda resuelto doblando el ADN en forma de un supermuelle, con una curvatura cercana al límite máximo posible, sin que suponga grave alteración del bicatenado. A su vez, el ADN permanece en una situación relativamente accesible en la superficie del complejo.

El nucleosoma representa sólo el nivel inferior de la estructura cromatínica. El siguiente nivel se caracteriza por el enrollamiento de rosarios de nucleosomas que adoptan la forma de solenoides y constituyen fibras de alrededor de 30 nanómteros (millonésimas de milímetro) de grosor, como sugirieron originalmente Aaron Klug y John

T. Finch, del laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigaciones Médicas de Cambridge. Estudios fisicoquímicos desarrollados en el nuestro y en otros laboratorios han conseguido reunir detallada información relativa al empaquetamiento de los cromosomas en el interior de la fibra [*véase la figura 8*]. Cada vuelta del solenoide contiene alrededor de 1200 pares de bases de ADN. Una de las consecuencias de esa compactación ordenada es facilitar la aproximación, en la cromatina, de elementos secuenciales separados por distancias considerables a lo largo del ADN.

¿Cómo se conjugan estas estructuras cromatínicas con los mecanismos de regulación anteriormente descritos? Estos últimos parecen requerir que el ADN se halle libre de constricciones, de manera que pueda reaccionar con las proteínas que controlan la transcripción. Algunos experimentos recientes sugieren que los nucleosomas sufren dislocaciones en las regiones promotoras de los genes que deben transcribirse, con objeto de facilitar al acceso a las proteínas reguladoras.

Estos dominios libres de nucleosomas se delatan a sí mismos por su inusual sensibilidad a la digestión por nucleasas. Observaron el fenómeno en eucariotas Sarah C. R. Elgin y Carl Wu, a la sazón en la Universidad de Harvard. También lo ha estudiado Harold Weintraub, del Instituto de Investigación del Cáncer Fred Hutchinson de Seattle. Alexander Varshavsky, del Instituto de Tecnología de Massachusetts, ha descrito un fenómeno similar en el virus SV40. James D. McGhee, William Wood y el autor identificaron, en 1981, un dominio hipersensible de alrededor de 200 nucleótidos de longitud en el gen de la beta-globina de núcleos aislados de eritrocitos de pollo. Estos últimos expresan el gen; en otros tipos de células de pollo, que no expresan dicho gen, no se detecta la hipersensibilidad a la nucleasa.

Considerando el tamaño del dominio hipersensible del gen de la beta-globina resulta obvio que no pueda contener un nucleosoma normal. Tal y como Beverly M. Emerson ha puesto en evidencia en mi laboratorio, a esta región se unen otras proteínas que, en el tubo de ensayo, evitan la unión de las histonas. Hemos purificado parcialmente estas proteínas y estudiado su interacción con el ADN. Se ha comprobado que existen dos o más proteínas específicas que se agarran fuertemente, y de manera altamente específica, a secuencias perfectamente definidas de la región hipersensible.

Tales lugares de unión pueden identificarse mediante "experimentos de huellas" (*footprinting*), en los que se tratan con nucleasas los complejos ADN-proteína. En los lugares donde aparecen proteínas protectoras, éstas evitan la digestión de las secuencias a las que están unidas. Recientemente, P. David Jackson, también en mi laboratorio, ha desarrollado un método para determinar directamente en el núcleo la "huella" de las proteínas engarzadas. El examen de núcleos procedentes de eritrocitos de pollo revela un patrón de protección del ADN en la vecindad del gen de la beta-globina muy similar al que se obtiene en los experimentos de enlace *in vitro*. Ello es demostrativo de que los factores específicos, parcialmente purificados, se unen en el interior del núcleo en los mismos lugares. Existen buenas razones para creer que esas proteínas protectoras colaboran en la regulación de la expresión del gen de la globina.

La organización estructural en la vecindad del gen activo de la globina sirve para ilustrar la complejidad de las deformaciones e interacciones que caracterizan el funcionamiento del ADN. El dominio hipersensible contiene segmentos de ADN que pueden adoptar en parte conformaciones monocatenarias; contiene asimismo una secuencia repetida en disposición invertida y abundantes sitios de metilación. Además de las secuencias que se unen a proteínas dentro del dominio hipersensible, las secuencias *CAAT* y *TATA*, más próximas al lugar de inicio de la transcripción, probablemente interactúen con sus propias proteínas, dotadas de especificidad de reconocimiento. Nuestros ensayos de "huellas" intranucleares sugieren que los nucleosomas se colocan bidireccionalmente más allá de ese dominio, ejerciendo su constricción característica sobre el ADN.

No obstante haberse destacado aquí los mecanismos de la expresión génica, el ADN también se enzarza en otras reacciones asociadas con su replicación y con la redistribución de sus segmentos en el genoma. La reaccionabilidad y flexibilidad conformacional del ADN desempeñan un importante cometido en todas esas reacciones. Probablemente, los métodos estructurales y químico-físicos, unidos a la poderosa tecnología hoy disponible para aislar y manipular secuencias de ADN, facilitarán durante la próxima década información detallada acerca de los mecanismos que regulan esas reacciones.

ARN

En todas las células, la información genética almacenada en el ADN se convierte en proteína con el concurso del ARN. Para llevar a cabo su función, éste sufre grandes modificaciones. Los primeros genes pudieron ser trozos de ARN

James E. Darnell, Jr.

En todas las células vivas la síntesis de proteínas está dirigida por la información genética almacenada en el ADN. En la transferencia de información media el ácido ribonucleico o ARN. El mensaje contenido en el ADN se transcribe en una molécula de ARN mensajero y se lleva a unas estructuras denominadas ribosomas. Allí se traduce en proteínas específicas con la ayuda del ARN transferente, que transporta aminoácidos y los va engarzando en la cadena proteínica que se está formando. Los ribosomas albergan, a su vez, un tercer tipo de ARN, que le sirve de componente estructural. En cualquiera de estas tres funciones, el ARN resulta tan decisivo para el funcionamiento normal de una célula como lo puedan ser el ADN y las proteínas. De hecho, es la molécula "puente" entre ambas. Si no fuese por el ARN, el mensaje genético nunca llegaría a expresarse.

La expresión de genes diversos, y por tanto la síntesis de proteínas diferentes, es lo que distingue a una célula del cerebro de una célula muscular. Aunque hablando en términos generales todas las células de un individuo contegan el mismo ADN, no todos los genes están activos en todas las células. En los años 60, el interés por conocer cómo se controlaba la expresión de los genes llevó a un grupo de investigadores a centrarse en los estudios sobre la síntesis de ARN, fundamentalmente de ARN mensajero (ARNm). Se daba en aquella época por sentado que una molécula de ARNm era una simple transcripción de un segmento concreto de ADN. De acuerdo con esa idea, el control de la expresión de los genes se basaba exclusivamente en la decisión de cuál de ellos debía transcribirse.

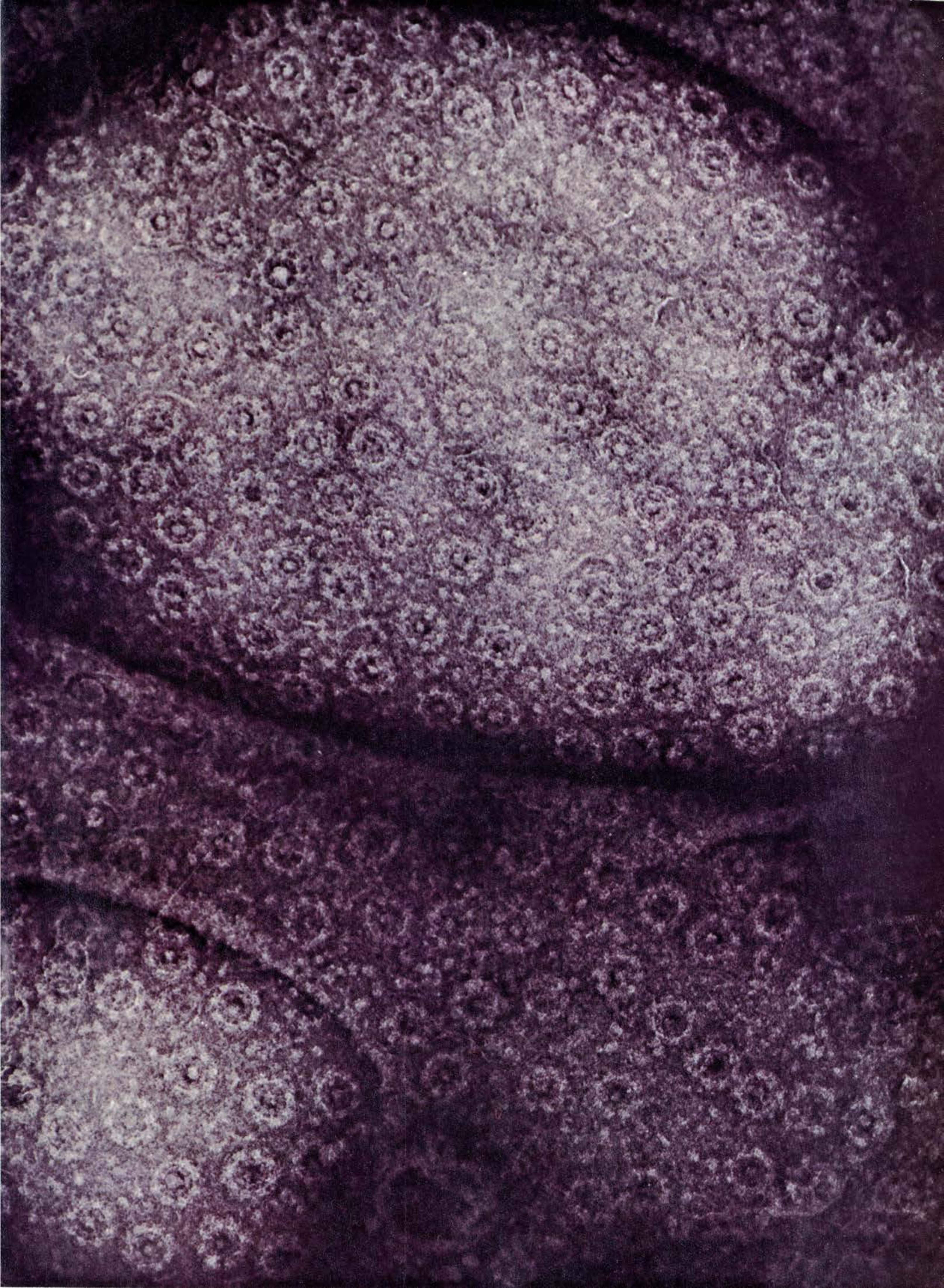
Esto es cierto en las bacterias, que son células simples carentes de núcleo. En todas las células eucarióticas (nucleadas), sin embargo, la síntesis de ARNm es algo más complejo que una mera transcripción. Una vez transcrito, el ARN sufre en el núcleo un elaborado proceso de maduración antes de pasar al citoplasma a través de los poros nucleares. Uno de los avances más espectaculares en el desarrollo de la biología molecular, desde el descubrimiento de la doble hélice de ADN, ha sido quizás el descubrimiento de que muchos genes eucarióticos están fragmentados, y que la molécula primaria de ARN debe sufrir por tanto un proceso de corte y empalmes hasta formar el ARNm. El mensajero no es una copia "literal" del ADN. Por el contrario, al igual que una película o un artículo periodístico, debe sufrir un riguroso proceso de elaboración, durante el cual se elimina una buena cantidad de material.

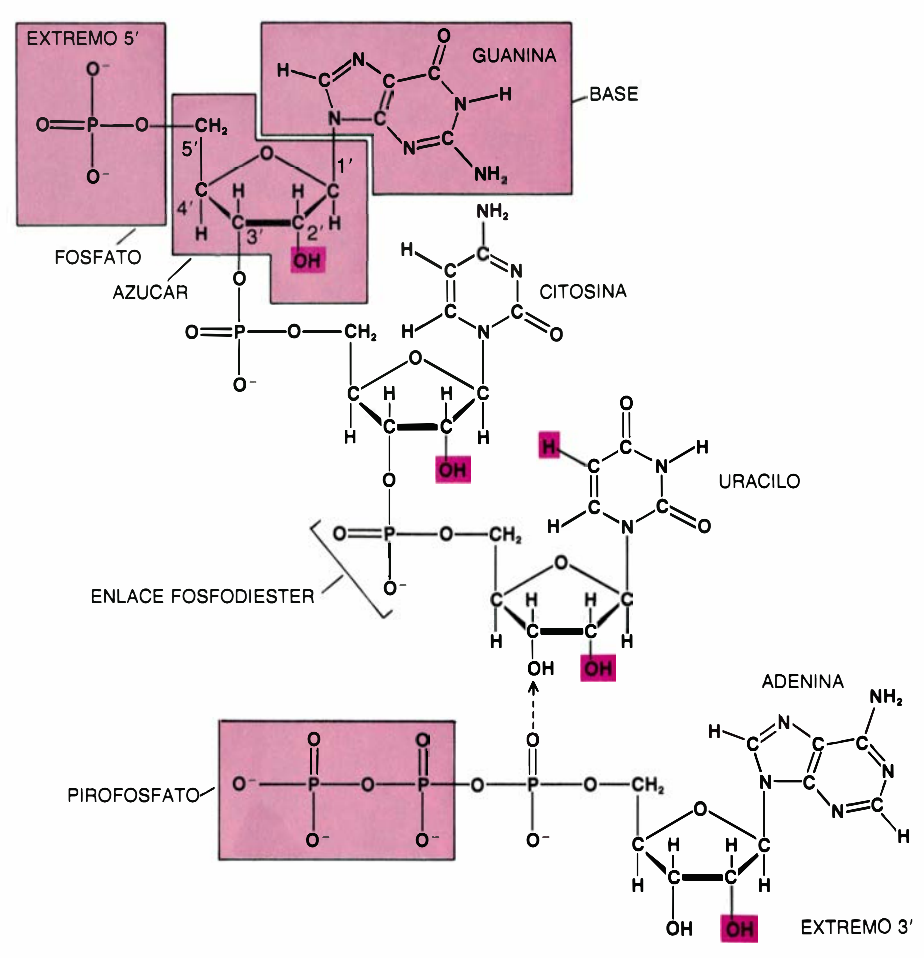
La existencia de un proceso de maduración en el ARN permite otras posibilidades de control de la expresión génica distintas del control de la transcripción. Por ejemplo, un único producto primario de la transcripción, o transcrito, puede sufrir diferentes tipos de cortes y empalmes que resulten en moléculas de ARNm distintas con información para proteínas diferentes. Se conoce un buen número de genes sometidos a este tipo de control. La mayoría, no obstante, parecen regularse de forma "convencional", es decir, decidiendo si deben o no transcribirse. La maduración del ARN añade una dimensión nueva al problema del funcionamiento celular, aunque no explica qué mecanismos utilizan las células de un organismo para diferenciarse unas de otras.

El fenómeno de la maduración del ARN puede arrojar, no obstante, alguna luz sobre la evolución celular y otras cuestiones del mismo tenor. Es muy probable que el ARN fuese el primer biopolímero. En un ambiente similar al que debió existir en la tierra primitiva pueden formarse espontáneamente cadenas cortas de ARN, no así de ADN o proteínas. Se conocen, además, casos en los que ciertas moléculas de ARN se cortan y empalman por sitios específicos en ausencia de las proteínas (enzimas) que facilitan estas operaciones en las células modernas. Este descubrimiento sugiere que el complejo proceso de maduración del ARN no es una adquisición evolutiva reciente. Tal proceso pudo haber estado funcionando y uniendo segmentos dispersos de información útil, como ahora, mucho antes de que surgiesen las primeras células. Con otros muchos investigadores, me inclino a pensar que la existencia de estos mecanismos de maduración del ARN contribuyó a que se consiguiera con éxito la primera síntesis de proteína dirigida por un gen. En una etapa posterior, a partir de ARN y probablemente por retrotranscripción, se formaría ADN, que llegaría a convertirse en un depósito seguro de información genética.

La elección evolutiva del ADN como molécula portadora de la información genética queda reflejada en una de las dos principales características químicas que diferencian al ADN del ARN. Ambos están constituidos por nucleótidos, cada uno de los cuales

1. A TRAVES DE LOS POROS EL ARN SALE DEL NUCLEO, donde se transcribe a partir del ADN, para pasar al citoplasma; aquí, el mensaje genético se traduce en proteína. En la electromicrografía, realizada por Nigel Unwin, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, se observa una pequeña sección de la envuelta nuclear de ovocito de rana, aumentada unas 90.000 veces. En los bordes de los poros se aprecian estructuras anulares y, en el centro, una especie de tapón del que se proyectan ocho radios. Cada uno de esos complejos que forman el poro tiene un diámetro aproximado de una décima de micrometro. La envuelta nuclear, que observamos en la imagen, tiene unos 10 millones de poros. Antes de abandonar el núcleo, los transcritos de ARN sufren procesos de maduración. En el caso de los ARN mensajeros, por ejemplo, hay veces en las que se eliminan ciertos segmentos del transcrito, empalmándose los restantes.





2. ESTRUCTURA QUIMICA DEL ARN. Difiere de la correspondiente del ADN en dos aspectos (*color oscuro*). En primer lugar, la base timina, presente en el ADN, es sustituida por uracilo en el ARN. El uracilo posee un átomo de hidrógeno, en vez de un grupo metilo, unido a uno de sus carbonos. En segundo lugar, el azúcar presente en el ARN es la ribosa, que posee un grupo hidroxilo (OH), en vez de un hidrógeno, en su carbono 2′; en el ADN, el azúcar es la desoxirribosa. En la síntesis de ADN y ARN, el nucleótido recién añadido a la cadena (en este caso trifosfato de adenosina, o ATP) se une por su posición 5′ al grupo hidroxilo 3′ del último nucleótido mediante un enlace fosfodiéster (*centro*). En esta reacción se elimina un pirosfosfato.

consta de una base nitrogenada, un azúcar de cinco carbonos y un grupo fosfato. Ahora bien, en el ARN el azúcar es ribosa; en el ADN, desoxirribosa. La diferencia radica en la posición 2′ del anillo del azúcar, que posee un grupo hidroxilo (OH) unido al carbono en el caso de la ribosa, mientras que la desoxirribosa tiene un átomo de hidrógeno. El grupo hidroxilo 2′ queda libre cuando los ribonucleótidos se unen para formar ARN, lo que hace que el ARN sea químicamente menos estable que el ADN. En una solución acuosa, el ARN se hidroliza mucho más deprisa. Ello determina que el ADN esté mejor adaptado para conservar información durante períodos largos. (Esa misma razón justifica la dificultad de estudiar el ARN en el laboratorio, lo que a su vez explica en parte que hasta muy recientemente la investigación química sobre el ARN fuera por detrás de la relativa al ADN.)

La otra diferencia química entre los dos ácidos nucleicos afecta a una de sus cuatro bases. La timina (*T*) del ADN se sustituye en el ARN por una base muy parecida, el uracilo (*U*). Al igual que la timina, el uracilo tiene por base complementaria sólo adenina (*A*). Durante la síntesis de ARN, la adenina del ADN se transcribe en uracilo y la timina en adenina. La citosina (*C*) se transcribe en guanina (*G*) y viceversa.

Comienza la transcripción cuando una enzima, la denominada polimerasa de ARN, se une a una secuencia específica de bases presente en el ADN, el promotor. La enzima desenrolla parte de la doble hélice y deja así expuestas dos cadenas sencillas de ADN, una de las cuales se transcribirá. A medida que la polimerasa recorre el ADN, nucleótidos de ARN con bases complementarias a las que porta el ADN se van añadiendo uno a uno a la cadena de ARN que se está sintetizando. Cada uno de los nucleótidos que se van a incorporar lleva un grupo trisfosfato en la posición 5′. En la reacción de síntesis se pierde un pirofosfato (un grupo difosfato), quedando unido el extremo 5′ de dicho nucleótido con el grupo hidroxilo 3′ del nucleótido situado al final de la cadena mediante un enlace fosfodiéster (O–P–O). La molécula de ARN "crece", pues, en dirección 5′ → 3′. La polimerasa continúa trabajando hasta que encuentra otra secuencia de bases específica que actúa de señal de terminación. En este momento, se desprende la cadena sencilla de ARN y el ADN retorna a su forma original de doble hélice.

Las regiones del ADN que llevan instrucciones de síntesis de proteínas se transcriben en ARNm. Cada secuencia de tres nucleótidos en el ARNm se denomina "codón" y determina (codifica) un aminoácido. Las proteínas vienen a contener de 100 a 1000 aminoácidos, de donde la longitud de un ARNm oscilará entre 300 y 3000 nucleótidos.

La traducción de ARNm en proteínas es un proceso complejo que tiene lugar en los ribosomas. En el desciframiento de la información que lleva el ARNm intervienen dos tipos de ARN que no determinan proteínas: ARN de transferencia (ARNt) y ARN ribosómico (ARNr). Ambos se sintetizan de igual manera que el ARNm. Las moléculas de ARNt son pequeñas, de unos 70 a 80 nucleótidos de longitud, y poseen una estructura tridimensional con un arrollamiento característico. Con la ayuda de una enzima especial, cada ARNt reconoce y se une a uno de los 20 aminoácidos diferentes que se pueden encontrar en las proteínas. En el extremo de la molécula de ARNt opuesto al sitio por donde se ha unido el aminoácido hay un bucle, donde se encuentra el "anticodón", que es un triplete de nucelótidos complementario a un codón específico del ARNm.

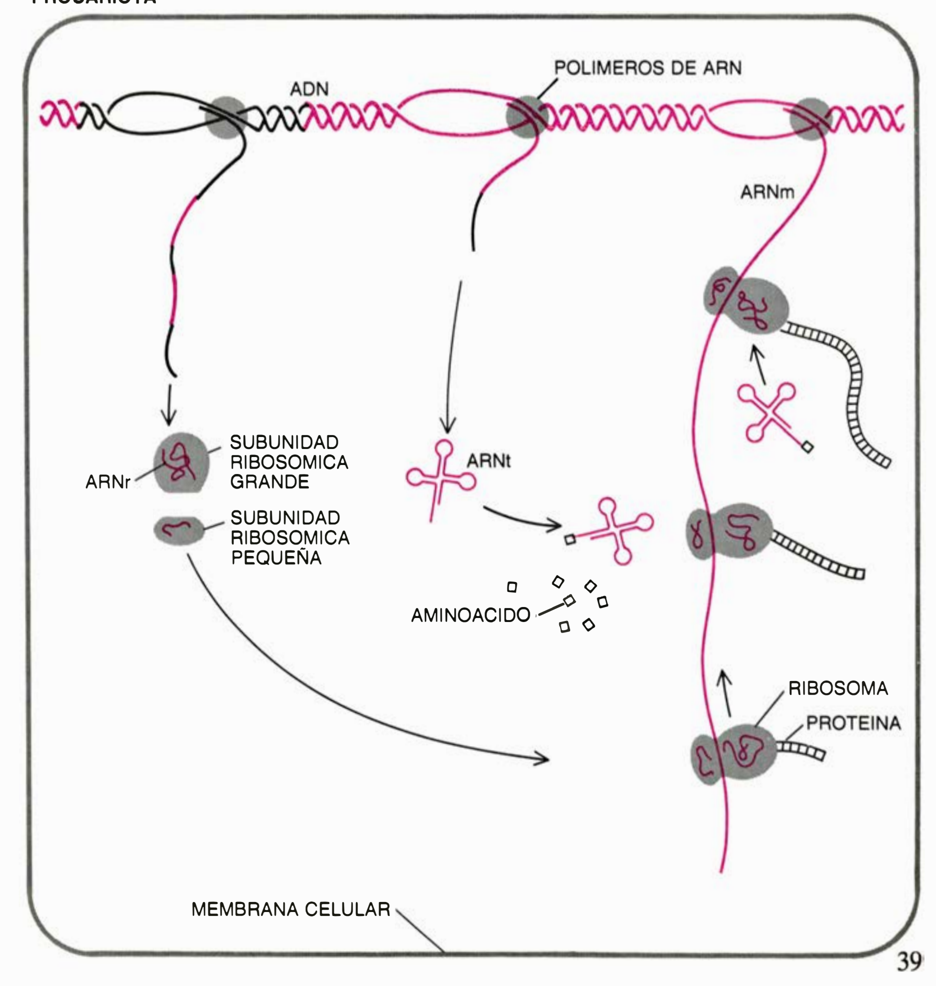
En la superficie de un ribosoma, los ARNt "cargados" con sus correspondientes aminoácidos entran en contacto con una molécula de ARNm. Consta el ribosoma de dos partículas, una grande y otra pequeña; se llaman ribonucleoproteínas, y cada una de ellas está compuesta a su vez por cierta cantidad de moléculas de proteína unidas a ARNr. En eucariotas, la partícula grande contiene tres moléculas de ARNr, una larga (de unos 4500 nucleótidos) y dos más pequeñas (de 160 y 120 nucleótidos, aproximadamente). La partícula pequeña posee una sola molécula de ARNr (formada por unos 1800 nucleótidos). El ARNr contribuye a dar al ribosoma su estructura acanalada, capacitándole para albergar simultáneamente un ARNm y una proteína.

A medida que el ribosoma, codón

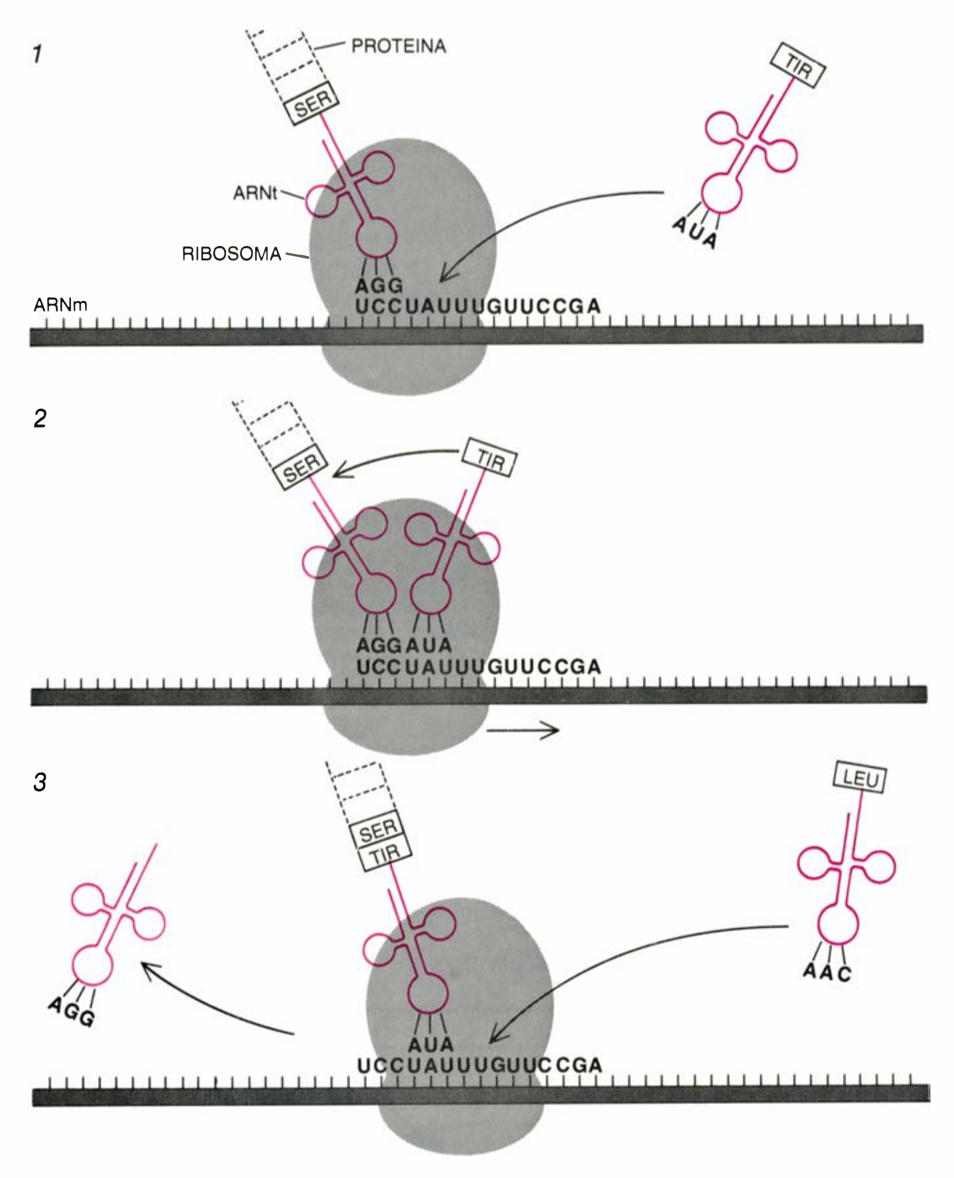
EUCARIOTA

TRANSCRIPCION
MADURACION
TRANSPORTE AL CITOPLASMA
TRADUCCION
ADN
POLIMERASA III
DEL ARN
ARNt
AMINOACIDO
ARNm
ARNt
PROTEINA
ARNr
RIBOSOMA
SUBUNIDAD
RIBOSOMICA
GRANDE
I
ARNr
SUBUNIDAD
RIBOSOMICA
PEQUEÑA
CITOPLASMA
II
INTRON
EXON
TRANSCRITO
PRIMARIO
ARNm
PORO NUCLEAR
NUCLEO
MEMBRANA CELULAR

PROCARIOTA



3. LA SINTESIS DE PROTEINAS tiene lugar, tanto en procariotas como en eucariotas, con los mismos tres tipos de ARN. Hay, no obstante, una diferencia importante. En eucariotas, las secuencias de ADN que determinan proteínas (exones) se encuentran a menudo separadas por otras secuencias espaciadoras (intrones) que deben eliminarse del transcrito primario para que se forme ARN mensajero (ARNm). En ambos tipos celulares, el ARN de transferencia (ARNt), ARN ribosómico (ARNr) y ARNm se transcriben a partir de una cadena de la doble hélice de ADN. Tres enzimas polimerasas distintas catalizan estas reacciones en eucariotas, mientras que en procariotas hay un solo tipo de polimerasa. En ambos tipos celulares, los transcritos primarios de ARNt y ARNr sufren procesos de maduración. Se cortan los extremos de los transcritos de ARNt y la molécula adopta entonces una estructura en forma de bucle. En el caso del ARNr, el transcrito corta por varios puntos y se forman dos tipos principales de ARNr, que una vez unidos con las correspondientes moléculas de proteínas darán lugar a las subunidades de los ribosomas. En procariotas, que no tienen núcleo, el transcrito de ARNm no suele sufrir el proceso de maduración. A medida que éste se está sintetizando, los ribosomas y los ARNt, con sus correspondientes aminoácidos, traducen la información que lleva dicho ARNm en una secuencia de aminoácidos, una proteína. En eucariotas, la envuelta nuclear facilita probablemente la eliminación de los intrones y el empalme de los exones del transcrito primario de ARNm, impidiendo además su traducción inmediata. El ARNm es "leído" después de que haya abandonado (al igual que el ARNt y las subunidades de los ribosomas) el núcleo a través de los poros que existen en la envuelta. En el citoplasma se reúnen el ARNm maduro, el ARNt y los ribosomas.



4. TRADUCCION de ARNm en proteína en un ribosoma: sigue los mismos pasos en procariotas y eucariotas. Cada triplete de nucleótidos, o codón, de la cadena de ARNm determina un aminoácido específico. Sucesivamente, cada molécula de ARNt aporta el aminoácido correspondiente a un codón. El reconocimiento ARNt-codón tiene lugar gracias a una secuencia complementaria de nucleótidos denominada anticodón. En el dibujo se muestra la adición de un aminoácido a una cadena de proteína. Una molécula de ARNt con el aminoácido tirosina se une al codón expuesto en el sitio correspondiente del ribosoma (*1*). La tirosina forma un enlace peptídico con la serina, último aminoácido de la cadena de proteína (*2*). Una vez que el ribosoma ha avanzado un codón (*3*), dejando el sitio libre para el siguiente ARNt, se libera el ARNt de la serina.

tras codón, avanza por el ARNm, los ARNt se van uniendo selectivamente al ARNm gracias a la especificidad del anticodón, y los aminoácidos que transportan se van añadiendo a la cadena de proteína naciente. La secuencia de codones del ARNm "dicta", por tanto, la secuencia de aminoácidos. El ribosoma cataliza todo el proceso, no sólo convocando a los ARNt y al ARNm, sino también a las proteínas y otros factores especializados en iniciar la "lectura" del ARNm, formar los enlaces peptídicos entre aminoácidos y liberar la proteína ya acabada, una vez que el mensaje genético se ha traducido por entero.

Aunque esta descripción de la síntesis de proteínas es aplicable a todas las células, eucarióticas y procarióticas (bacterias), gran parte de cuanto sabemos acerca de ese proceso se consiguió en estudios realizados con la bacteria *Escherichia coli*. Desde un principio se sospechaba que la expresión génica, y por tanto el comportamiento celular, podría controlarse regulando la síntesis del ARNm (en otras palabras, la transcripción del ADN). Una bacteria como *E. coli* no contiene en cada momento todos los posibles ARNm determinados por su ADN. Por el contrario, transcribe genes y fabrica las proteínas correspondientes sólo cuando lo necesita, en respuesta a estímulos ambientales. A principios de los años 60 François Jacob y Jacques Monod, del Instituto Pasteur de París, propusieron un modelo según el cual el gen para la enzima beta-galactosidasa de *E. coli*, proteína encargada de metabolizar la lactosa, estaba controlado por un represor: una proteína reguladora que bloqueaba la transcripción del gen cuando no se necesitaba la enzima. Para bloquear la transcripción, el represor se une específicamente al ADN en un sitio cercano al comienzo de la secuencia que determina la enzima. Posteriormente se ha comprobado que el modelo de Jacob y Monod es aplicable de forma general al control de la expresión génica en bacterias. Conocemos ya muchas proteínas reguladoras que fomentan o disminuyen la tasa de transcripción de genes bacterianos uniéndose a puntos específicos del ADN.

En los organismos multicelulares, cada célula forma parte de un conjunto de células interdependientes y no está obligada a responder por sí sola constantemente a cambios producidos en el ambiente exterior, como en el caso de las bacterias. Las variaciones más espectaculares, en cuanto a comportamiento celular se refiere dentro de un mismo organismo, corresponden a las propias diferencias entre los tipos de células existentes, todas las cuales contienen el mismo ADN. En el hombre, por ejemplo, sólo los eritrocitos fabrican hemoglobina, molécula que lleva el oxígeno a través del cuerpo. De la misma manera, una célula hepática fabrica al menos 50 proteínas que, o no se encuentran en otras células, o se fabrican en cantidades mucho menores.

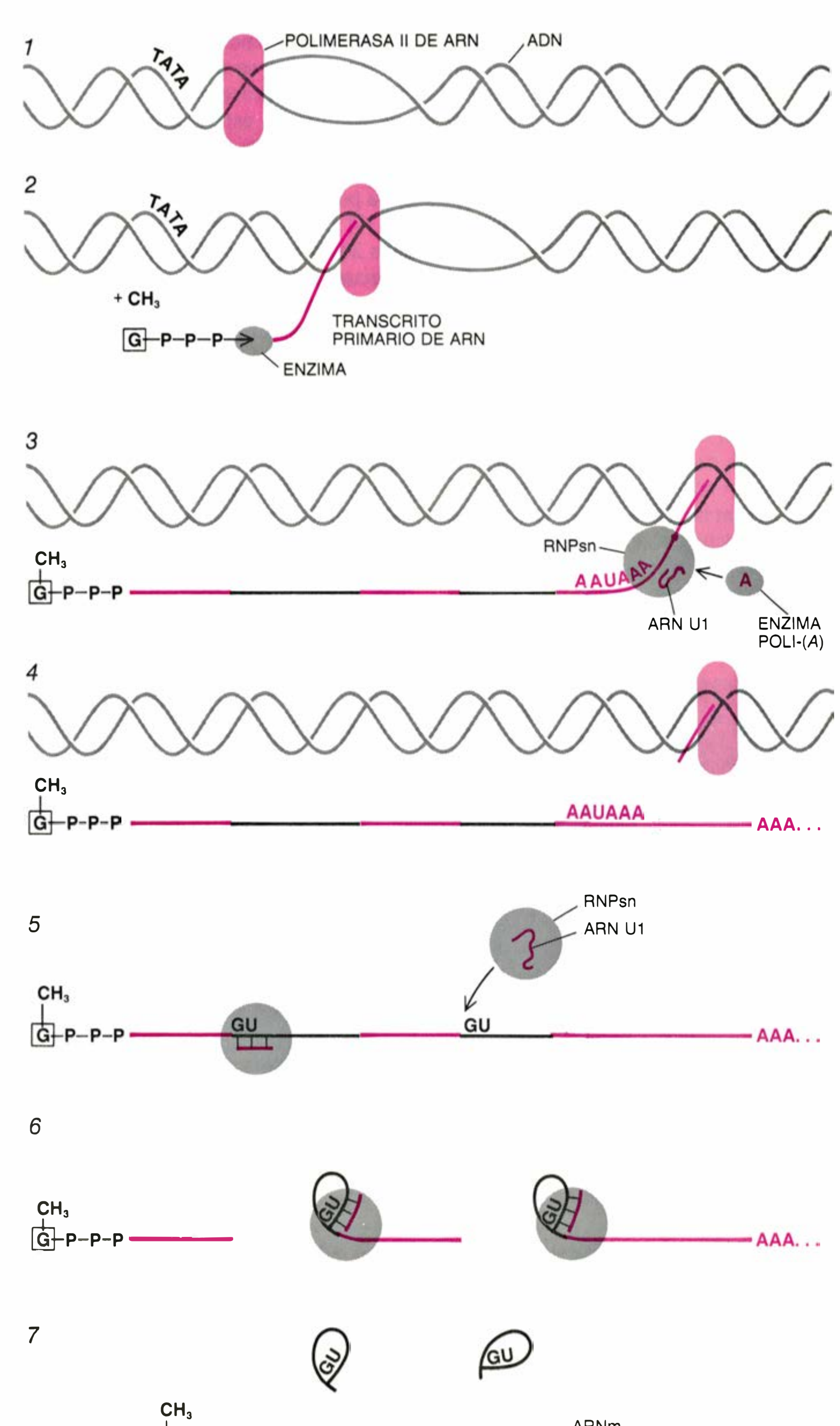
Tan pronto como Jacob y Monod propusieron su modelo, se pensó que esta especialización celular, al igual que el comportamiento variable de las bacterias, podía estar controlada mediante la transcripción génica. Tardóse, sin embargo, 20 años en comprobarlo. Influyó en ello el descubrimiento de que la mayor parte de los ARN sufren un proceso de maduración una vez transcritos. La existencia de este proceso abría la posibilidad de que la expresión génica se controlase también durante el mismo. Por ejemplo, un determinado transcrito de ARN puede sintetizarse en todas las células y sólo llegar a madurar en algunas. Cabe también que la tasa de maduración sea diferente, de tal suerte que distintos tipos celulares pueden contener cantidades

diferentes de un cierto ARNm y su correspondiente proteína. A finales de los años sesenta, los interrogantes sobre la síntesis del ARNm se convirtieron en el nudo del problema general planteado por el control de la expresión génica.

La existencia del proceso de maduración se detectó primero en el ARNr, no en el ARNm. En 1960 iniciamos en el Instituto de Tecnología de Massachusetts unos trabajos cuyo objetivo era caracterizar en células humanas la fracción de ARN nuclear que acaba de sintetizarse. (Para identificar este tipo de ARN se suministran nucleósidos a las células, que son los precursores de los nucleótidos, marcados radiactivamente y se le sigue la pista al ARN que se sintetiza inmediatamente.) Comprobamos con sorpresa que no se detectaba ARN nuclear radiactivo de tamaño similar a los ARNr que se localizaban en los ribosomas maduros. Demostramos, en cambio, que los dos tipos de ARNr, grande y pequeño, se originaban a partir de una sola molécula precursora mayor, un transcrito primario, que se cortaba por sitios específicos. En los años siguientes se pudo comprobar que los ARNr y ARNt de muchos tipos celulares también se formaban a partir de un transcrito primario que se cortaba por sitios específicos. Demostróse pronto que todos los ARNr y ARNt, tanto de eucariotas como de procariotas, se originaban así y recibían además ciertas adiciones químicas antes de participar en la traducción del ARNm.

¿Qué ocurre con el ARNm? En bacterias, que no tienen núcleo, parece improbable que el ARNm sufra procesos de maduración, ya que es inmediatamente "colonizado" por ribosomas y ARNt, antes incluso de que termine su síntesis. En eucariotas, sin embargo, el ARNm se sintetiza en el núcleo y debe emigrar posteriormente al citoplasma para ser traducido en proteína. Entre transcripción y traducción hay muchas oportunidades para que ocurra el proceso de maduración.

Determinar si tal proceso ocurre ha supuesto para los investigadores enfrentarse, en primer lugar, con un problema no pequeño: una célula eucariótica típica contiene miles de tipos de ARNm. Para soslayar esta dificultad se estudiaron células animales infectadas con virus. Los virus cuyo material genético es ADN usurpan la maquinaria de hacer ARNm y proteínas de la célula hospedadora, pero tienen la ven-



5. SINTESIS DE ARN MENSAJERO. En eucariotas comienza cuando una polimerasa de ARN inicia la transcripción de un ADN. Esto tiene lugar unos 20 a 30 nucleótidos "curso abajo" de la secuencia *TATA* (*1*). Antes de que el transcrito mida más allá de 30 nucleótidos, se le añade una "caperuza" a su extremo 5'. Esta caperuza es una guanosina metilada y con un grupo trifosfato (*2*). La enzima polimerasa se mueve a lo largo del ADN (*3*), transcribiendo tanto exones (*color*) como intrones (*negro*). Finalmente, transcribe la secuencia *AAUAAA*. Unos 20 nucleótidos curso abajo se corta el transcrito, reacción en la que probablemente esté implicada una pequeña ribonucleoproteína nuclear (RNPpn) que contiene un "ARN U1", rico en la base uracilo. Una enzima agrega una "cola" de 150 a 200 *A* al extremo 3' (*4*). El transcrito se corta luego por los intrones (*5*), con la probable ayuda de alguna pequeña ribonucleoproteína nuclear, ya que el ARN U1 puede aparearse con una secuencia (en la que están presentes las bases *GU*) que existe al principio de los intrones. Los intrones se arrollan en lazos (*6*) y se eliminan; los exones se empalman y forman el ARNm.

taja de que su ADN, en comparación con el del hospedador, lleva información para bastantes menos proteínas, con lo que se transcribe en bastantes menos ARNm. Por tanto, la síntesis del ARNm vírico puede constituir un modelo sencillo que explique cómo se desarrolla la síntesis del propio ARNm de la célula animal. Esta aproximación experimental permitió, entre 1970 y 1977, conocer las etapas básicas del proceso de síntesis del ARNm eucariótico.

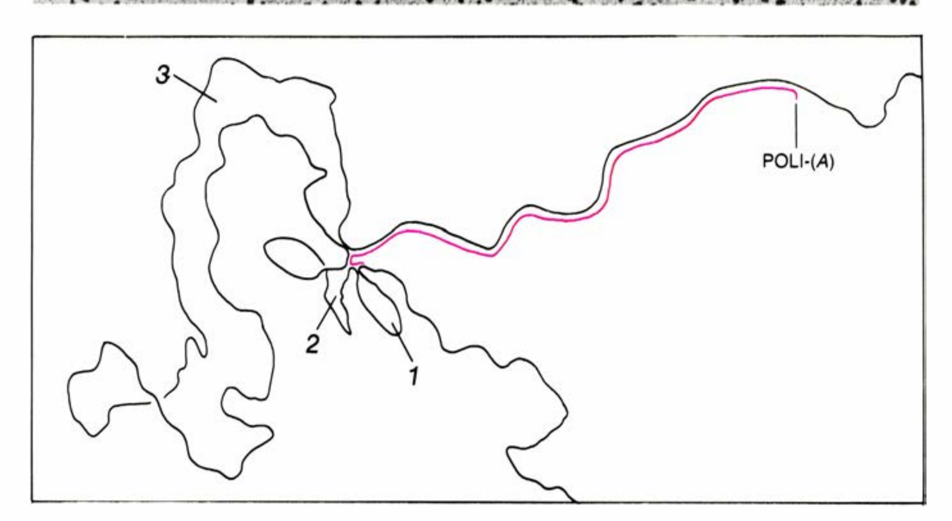
Si se compara con lo que ocurre en bacterias, la complejidad del proceso es evidente desde las primeras etapas. Mientras en bacterias una única enzima polimerasa cataliza toda la síntesis del ARN, en eucariotas hay tres polimerasas distintas. El tipo I es específico para el precursor del ARNr, el tipo II para el del ARNm y el tipo III para el del ARNt y otros pequeños ARN. La síntesis de un ARNm comienza cuando una polimerasa II de ARN reconoce una región "promotora" en la doble hélice de ADN y se une a ella. El papel de las varias secuencias de nucleótidos que conforman esta región promotora no es conocido en su totalidad. Se sabe, no obstante, que la disposición correcta de la polimerasa depende de la secuencia *TATA*. La transcripción comienza unos 20 a 30 nucleótidos curso abajo de la secuencia *TATA*.

Aproximadamente un segundo más tarde, cuando el ARN no mide aún 30 nucleótidos, al primer nucleótido de la cadena (extremo 5′) se le añade una "caperuza" (*cap*) química protectora. La caperuza, presente en todos los ARNm eucarióticos, es una guanosina metilada unida al primer nucleótido mediante un puente trifosfato. (La guanosina es un nucleósido cuya base es la guanina.) Una vez colocada la caperuza, la polimerasa continúa añadiendo nucleótidos al extremo 3′ de la cadena, a una velocidad de 30 a 50 por segundo. El transcrito primario que resulta puede llegar a medir unos 200.000 nucleótidos; en las células humanas el tamaño medio es de unos 5000 nucleótidos.

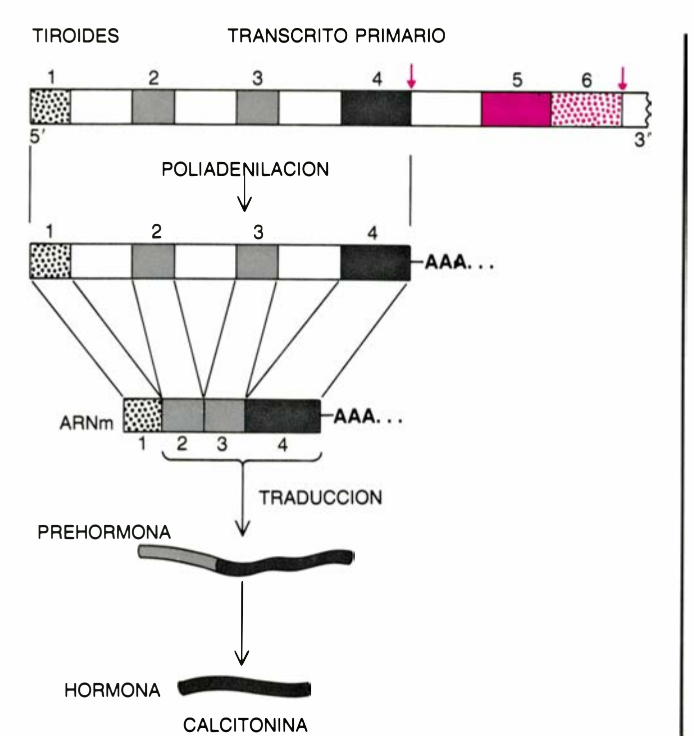
La maduración del transcrito comienza con la adición de una "cola" al nucleótido terminal de la cadena de ARNm (extremo 3′). Entre 1970 y 1971 investigadores de varios laboratorios encontraron que la mayoría de los ARNm de mamíferos llevaban un añadido en su extremo 3′, consistente en una secuencia de unos 150 a 200 nucleótidos de adenina, secuencia denominada poli-*A* para abreviar. Ahora sabemos que el corte del transcrito primario y la adición del poli-*A* al extremo libre ocurre unos 20 nucleótidos curso abajo de la secuencia *AAUAAA*. Estas reacciones tienen lugar en un minuto, en cuanto la polimerasa ha pasado por el sitio donde se va a colocar el poli-*A*.

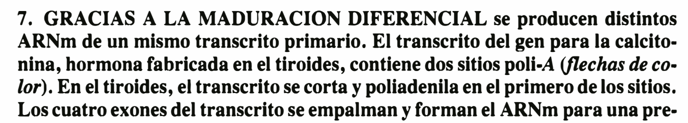
Advertida la presencia de caperuza y cola en el ARNm citoplásmico maduro, los investigadores iniciaron la búsqueda de estas estructuras en las moléculas presentes en el núcleo, con la esperanza de localizar a los precursores de los ARNm. Tales precursores se encontraron, en 1976, entre el ARN nuclear recién sintetizado, pero no acabaron los problemas. Las células nucleares alcanzaban una longitud media de 5000 nucleótidos, mientras que la longitud media de los ARNm presentes en el citoplasma rondaba sólo el millar. Obviamente, el precursor debía sufrir algunos cortes para convertirse en ARNm. Pero, ¿cómo podían seguir conservándose la caperuza y la cola?

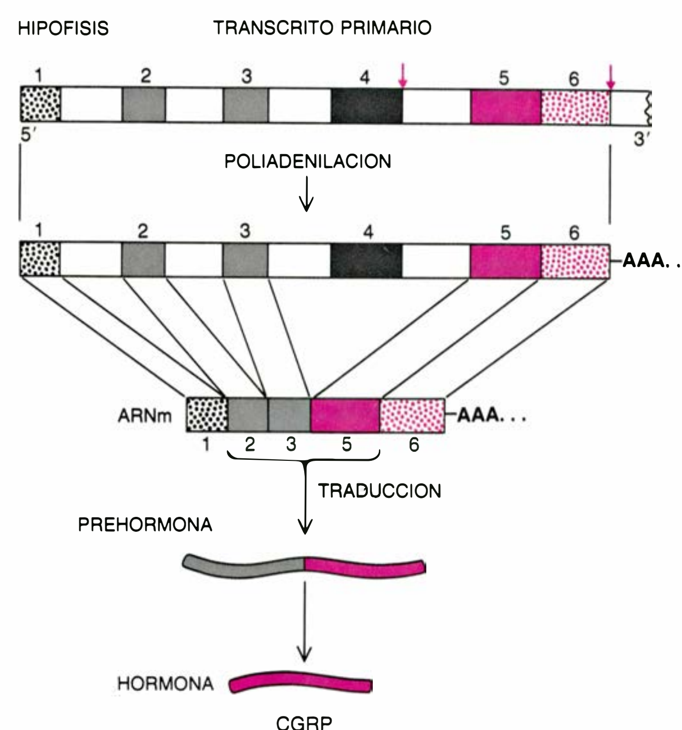
Visto desde nuestra perspectiva actual, la respuesta parece inmediata. Para conservar los extremos basta eliminar una parte central del transcrito y "empalmar" los trozos que quedan. Este proceso de corte y empalme del ARN se observó por primera vez en adenovirus, virus que infectan la parte superior del aparato respiratorio humano. Mis colegas y yo encontramos que los ARNm para cierto grupo de proteínas de adenovirus (denominadas proteínas tardías porque se sintetizan en un estado avanzado de la infección) derivan todos de un único transcrito primario. En 1977, un grupo del MIT dirigido por Phillip A. Sharp y otro grupo del Laboratorio de Cold Spring Harbor (del que formaban parte Richard J. Roberts, Thomas R. Broker, Louise T. Chow, Richard E. Gelinas y



6. EMPALMES EN EL ARN MENSAJERO, cuya existencia se descubrió estudiando el genoma de los adenovirus. La electromicrografía muestra el resultado de un experimento en el que se dejó hibridar el ARNm (*línea coloreada en el esquema*) de una proteína de adenovirus con una cadena sencilla del ADN para dicha proteína (*negro*). Allí donde sus secuencias nucleóticas resultan complementarias, las dos moléculas forman un híbrido bicatenario. Tres regiones del ADN que no encuentran su secuencia complementaria en el ARN forman bucles (*1-3*). Es evidente que la parte del transcrito de ARN correspondiente a esas regiones ha sido eliminada del ARNm, y que las restantes se han empalmado. (Electromicrografía de Louise T. Chow.)







7. GRACIAS A LA MADURACION DIFERENCIAL se producen distintos ARNm de un mismo transcrito primario. El transcrito del gen para la calcitonina, hormona fabricada en el tiroides, contiene dos sitios poli-*A* (*flechas de color*). En el tiroides, el transcrito se corta y poliadenila en el primero de los sitios. Los cuatro exones del transcrito se empalman y forman el ARNm para una prehormona, que una vez cortada enzimáticamente da lugar a la calcitonina. En la hipófisis y en algunas neuronas se corta el mismo transcrito primario por el segundo de los sitios poli-*A*. A la hora de los empalmes, la secuencia para la calcitonina (*gris oscuro*) se elimina junto con los intrones; ocupando su lugar se incluye en el ARNm definitivo una secuencia que determina la PRGC.

Daniel Klessig) demostraron cómo ocurría este proceso; para ello recurrieron a la hibridación molecular.

Fúndase esta técnica en la existencia de complementaridad entre el ARNm y el ADN del que se ha transcrito; ambos pueden formar, pues, un híbrido bicatenario. (Una de las cadenas del ADN queda desplazada.) El híbrido se deja visualizar en las electromicrografías. Cuando se realizó el experimento con los ácidos nucleicos que determinaban las proteínas tardías de los adenovirus, cada uno de los ARNm hibridó con cuatro regiones del ADN, regiones que estaban separadas por largos fragmentos de ADN que sobresalían del híbrido formando bucles, manifestando de este modo que sus secuencias nucleotídicas no tenían contrapartida en el ARNm. Los grupos del MIT y Cold Spring Harbor dedujeron que el ARNm se constituía empalmando cuatro segmentos dispersos del transcrito primario. Para ello deben eliminarse las secuencias existentes entre estos segmentos, con lo que el ARNm ya terminado es mucho más corto que el transcrito primario. No obstante, la caperuza 5′ y la cola 3′ de poli-*A* se siguen conservando.

El proceso de cortes y empalmes del transcrito primario de adenovirus dura unos 20 a 30 minutos, aunque en otros casos la operación tardará sólo cinco minutos. Siguiendo los pasos de los grupos del MIT y Cold Spring Harbor, otros investigadores demostraron pronto que muchos ARNm, víricos y celulares, formábanse empalmando segmentos de un precursor largo y desechando el resto de la molécula. Los sitios específicos donde ocurrían los empalmes se identificaron posteriormente analizando las secuencias nucleotídicas de un ADN y el correspondiente ARNm maduro. Se acepta ahora ampliamente que muchos genes eucarióticos están fragmentados y no se expresan si no es tras el correspondiente proceso de maduración del ARN transcrito. Walter Gilbert, de la Universidad de Harvard, acuñó el término exones para referirse a los segmentos de un gen que se expresan en ARNm y proteína. Las secuencias nucleotídicas ubicadas entre los exones, y que se eliminan del ARN, se denominan intrones.

¿Qué tipo de mecanismo asegura que los exones se unan correctamente? La cuestión es importante ya que un error de un solo nucleótido inutilizaría la proteína. Las investigaciones en curso están revelando las características bioquímicas del proceso con notable pormenor. Hasta tal punto, que el proceso de corte y empalme se ha podido reproducir en el laboratorio. Utilizando extractos celulares se ha conseguido unir dos exones que estaban separados por un intrón en una molécula de ARN experimental. Aunque no se conocen todos los pasos enzimáticos del proceso, se han identificado ya algunos de los elementos esenciales presentes en los extractos.

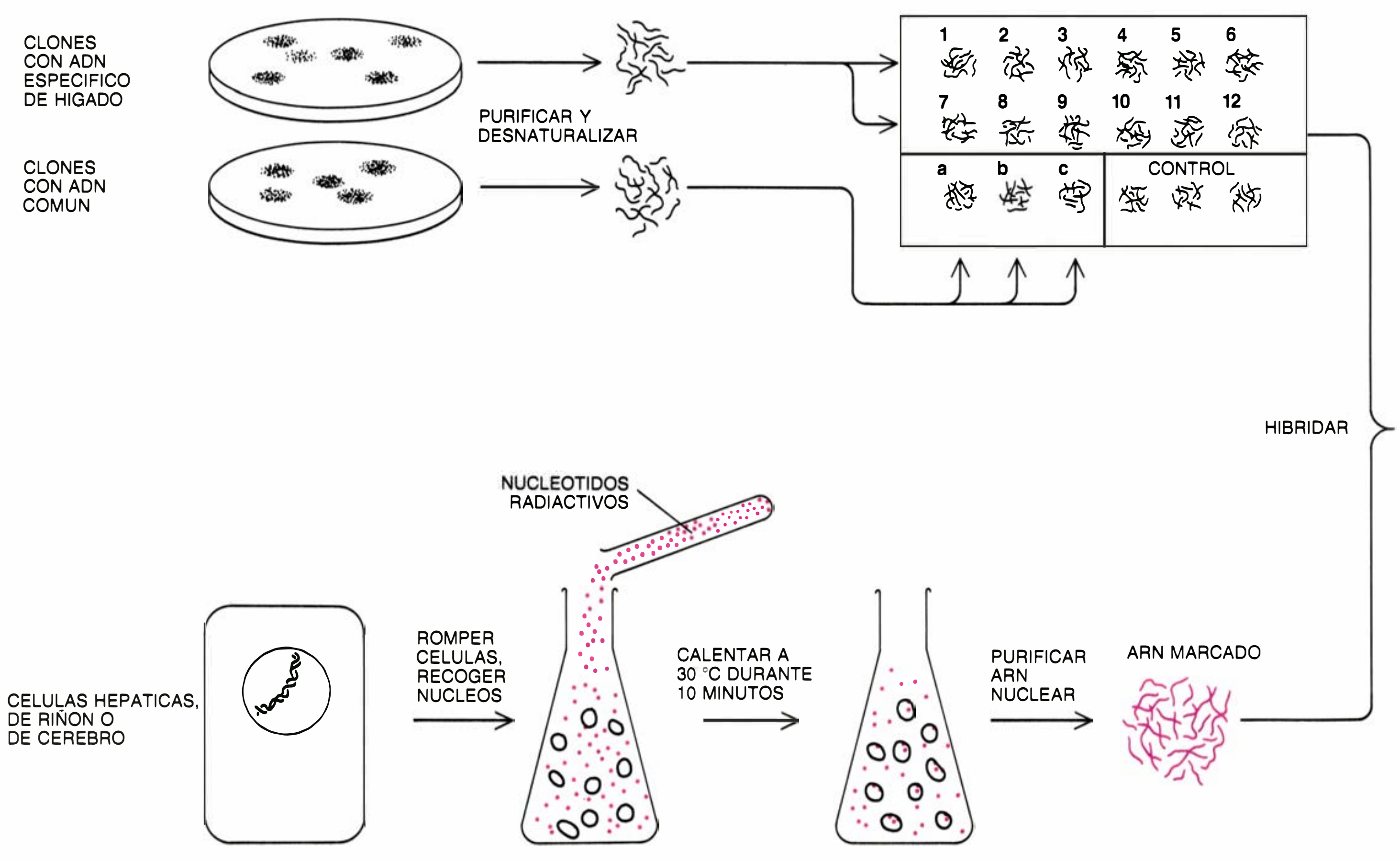
Uno de estos elementos son ciertas ribonucleoproteínas, partículas que se encuentran en los núcleos de todas las células animales. Denominadas "pequeñas ribonucleoproteínas nucleares"(RNPpn, también conocidas por las siglas inglesas de snRNP), constan de un grupo proteico unido a una molécula de ARN. Este, que difiere de los tres grupos principales de ARN descritos antes, mide entre 100 y 300 nucleótidos de longitud. Existen al menos 10 tipos distintos de esas moléculas cortas de ARN. Seis de ellos son muy ricos en la base uracilo, por lo que se denominan ARN-U. El conocido como ARN U1 reviste particular interés.

Las pruebas de que las RNPpn desempeñan un papel fundamental en el mecanismo de cortar y empalmar ARN proceden de experimentos en los que se utilizan anticuerpos específicos contra el componente proteico de tales partículas. Por razones desconocidas,

tales anticuerpos son producidos abundantemente por individuos que padecen ciertas enfermedades inmunológicas, como el lupus eritematoso sistémico. Joan A. Steitz y sus colegas, de la Universidad de Yale, han aislado anticuerpos contra RNPpn; junto con el grupo de Sharp del MIT, se los han añadido a extractos celulares capaces de cortar y empalmar ARN. Cuando se añade el anticuerpo a un extracto antes de agregar la molécula de ARN, ésta permanece intacta. No se corta, ni siquiera se poliadenila. Ello indica que las RNPpn participan tanto en el proceso de corte del transcrito primario por el sitio donde se añadirá el poli-*A* como en la localización y eliminación de los intrones. Se desconoce cómo realizan este trabajo las RNPpn y si las mismas partículas participan en ambos procesos. Según una hipótesis compartida por muchos, una única estructura grande, parecida al ribosoma, formada por RNPpn y otras partículas, lleva a cabo ambos procesos. Con toda probabilidad, el proceso de corte y empalme implica el reconocimiento de un intrón por una RNPpn con un ARN U1, que se une a bases complementarias del comienzo del intrón.

El descubrimiento de los intrones en 1977 constituyó una auténtica sorpresa. Hasta ese momento, los biólogos moleculares creían que los genes eran segmentos simples y continuos de ADN que determinaban, cada uno, una sola proteína. Además del problema de desentrañar el mecanismo de corte y empalme, el descubrimiento planteó de inmediato dos cuestiones mucho más generales. En primer lugar, conocer la importancia real del proceso de maduración del ARN, y más concretamente el mecanismo de corte y empalme, en la regulación de la expresión génica en eucariotas. En segundo lugar, dudábase si los genes habían estado siempre fragmentados o si, por el contrario, los intrones habíanse introducido gradualmente a lo largo de la evolución.

Conocida la naturaleza fragmentada de los genes, cabe imaginar que el proceso de maduración del ARN interviene de manera decisiva en la regulación de la expresión génica. Dentro de una célula, los niveles de proteínas pueden venir determinados por la cantidad de ARNm que llega a madurar. No sólo eso; un gen puede determinar más de una proteína, y la decisión de cuál fabricar en un determinado momento o en una célula dada puede depender del tipo de maduración que se siga. Un transcrito primario con dos o más sitios donde colocar la secuencia poli-*A* puede cortarse por cualquiera de esos puntos, resultando en cada caso un ARNm con un extremo 3′ distinto y por tanto una proteína diferente. Dependiendo de qué tipos de cortes y empalmes se den, a partir de un transcrito con tres o más exones se pueden ob-



8. PREDOMINIO DEL CONTROL TRANSCRIPCIONAL de la expresión génica sobre el control a través de la maduración del ARN; se demostró gracias a las técnicas de clonación de genes. Se clonó en bacterias ADN de ratón para proteínas específicas del hígado, así como ADN para proteínas comunes a la mayoría de las células de ratón. Se purificaron, desnaturalizaron y transfirieron a papel de filtro los ADN para 12 proteínas de hígado (*1-12*) y tres comunes (*a-c*), todas ellas distintas. Para determinar si todos estos ADN se transcriben en varios tipos celulares diferentes, se llevaron a cabo experimentos de hibridación con transcritos de ARN recién sintetizados, sin madurar, procedentes de células hepáticas, de riñón y de cerebro. Esos nuevos transcritos se aislaron a partir de núcleos de dichas células, se mantuvieron en frío y se incubaron brevemente a una temperatura de 30 °C en presencia de nucleótidos radiactivos. Como no hay transcripción cuando los núcleos están en frío, cualquier ARN marcado radiactivamente que se purifique a partir de los núcleos ha debido sintetizarse durante los 10 minutos que se mantuvieron a temperatura alta. A continuación se incubaron los ARN marcados radiactivamente con los filtros con los ADN.

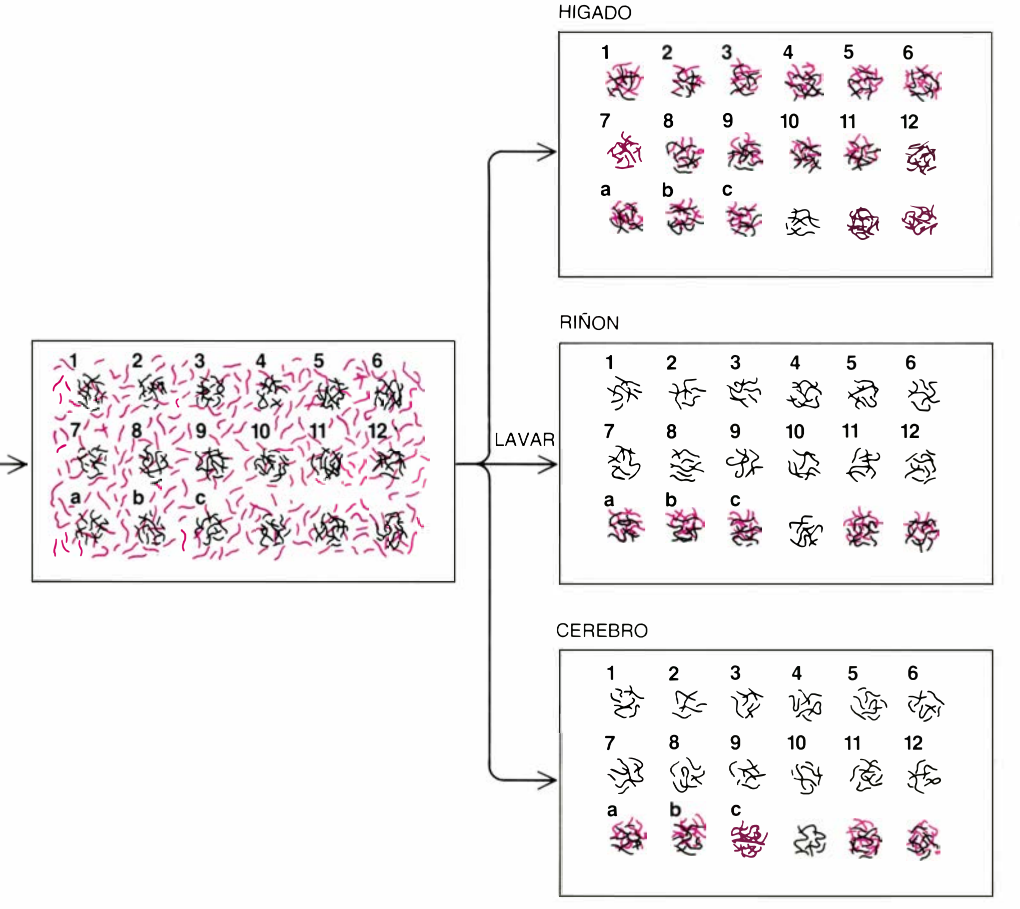
tener moléculas de ARNm que contengan desde todos los exones posibles hasta dos tan sólo. La decisión del tipo de corte que se lleva a cabo parece contar sólo con un par de limitaciones. Por un lado, deben conservarse los exones extremos, ya que a ellos deben unirse la caperuza 5′ y la cola 3′. Por otro, los exones deben disponerse en el mismo orden. Se han encontrado ya docenas de genes víricos y celulares que determinan más de un ARNm. Tales genes se denominan unidades de transcripción compleja. Un ejemplo de éstas es la unidad de transcripción de proteínas tardías de adenovirus, que contiene cinco sitios poli-*A* y numerosos exones. A partir de su transcrito primario se producen hasta una docena de ARNm distintos. Cada uno de estos ARNm consta de cuatro exones. Los tres primeros son comunes a todos ellos y el último exón contiene la secuencia que determina cada proteína específica.

También en células animales se conoce cierto número de unidades de transcripción compleja, que producen diferentes ARNm en razón de las circunstancias. Algunas de estas unidades se han encontrado en células musculares de mamíferos e insectos. Células musculares que cumplen funciones distintas requieren proteínas parecidas pero con ligeras diferencias. Tales proteínas parecen estar determinadas a menudo por un único gen cuyo transcrito primario puede ser cortado o poliadenilado de varias maneras.

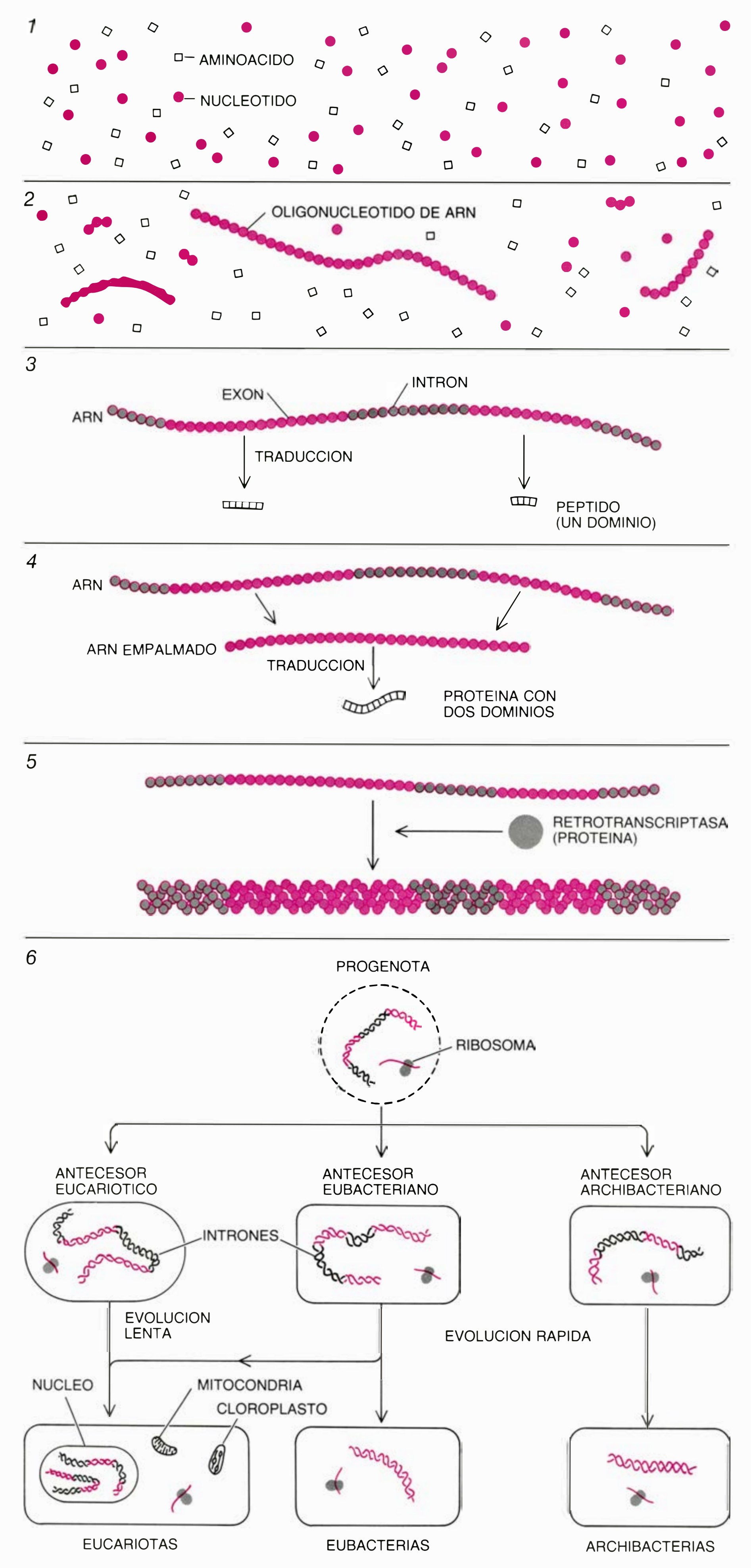
Un ejemplo revelador de este fenómeno –el control de la expresión génica mediante alternativas de maduración del ARN– se encuentra en la unidad de transcripción compleja aislada de ADN de rata por Ronald Evans y Michael G. Rosenfeld, del Instituto Salk para Estudios Biológicos. El segmento de ADN en cuestión determina la síntesis de calcitonina, una hormona producida en la glándula tiroides. Evans y Rosenfeld observaron, sin embargo, que tal segmento hibridaba también con un ARNm procedente de la glándula hipofisiaria (y posteriormente encontrado también en ciertas células nerviosas). Los investigadores demostraron que el transcrito primario de la calcitonina está presente en las células hipofisiarias y en las tiroideas. El transcrito contiene dos sitios de poliadenilación. En el tiroides, se corta por el primero de dichos puntos, y empalmando los correspondientes exones se produce el ARNm para la calcitonina. En la hipófisis, el transcrito se corta por el segundo de los sitios de poliadenilación y se elimina el exón que determina la calcitonina. Resulta de ello una molécula de ARNm que determina un neuropéptido desconocido hasta entonces: la denominada "proteína relacionada con el gen de la calcitonina", o PRGC.

El caso del gen de la calcitonina, además de ser un buen ejemplo de regulación génica mediada por la maduración del ARN, ilustra también una verdad más fundamental; a saber: el mecanismo predominante de control génico en eucariotas, lo mismo que en bacterias, no es una maduración alternativa, sino una transcripción alternativa. La mayoría de las células de rata no fabrican calcitonina ni PRGC, ni en ellas se transcribe el gen de la calcitonina. Para los biólogos moleculares esto no constituye sorpresa alguna, pues incluso después de descubiertos los mecanismos de maduración del ARN, la mayoría de los investigadores siguen pensando que el control transcripcional es la vía fundamental de control de la expresión génica. La alternativa, transcribir todos los genes en todas las células pero someter los transcritos a un proceso de maduración diferencial, se ha considerado siempre inverosímil. Recientemente, además, se ha podido comprobar gracias a la utilización de las nuevas técnicas de clonación de genes.

Mis colegas y yo hemos realizado experimentos de clonación cuyos resultados confirman que los genes que no se expresan tampoco suelen transcribirse. En tales experimentos extrajimos, en primer lugar, todo el ARNm de células hepáticas de ratón y lo copiamos en ADN, utilizando para ello la retrotranscriptasa, una enzima que cataliza la retrotranscripción del ARN en ADN. A continuación, insertamos el ADN dentro de plásmidos (pequeños círculos de ADN bacteriano) y lo introdujimos en un cultivo de *E. coli*. El



Los transcritos procedentes de las células de riñón y cerebro hibridaron sólo con los ADN "comunes" y no con los específicos de hígado. Esto demostraba que los genes específicos de hígado no se transcribían en riñón y cerebro. Si los genes se transcribiesen y los transcritos se fuesen destruyendo en el momento de la maduración, cabría esperar que algunos transcritos específicos de hígado estuviesen presentes en las mezclas de ARN no maduro de las células de riñón y cerebro y hubiesen hibridado con el ADN específico de hígado. Como se esperaba, los transcritos procedentes de las células hepáticas hibridaban con ambos tipos de ADN. Los híbridos quedan fijados en el papel de filtro cuando éste se lava. Al ser radiactivos, forman manchas oscuras sobre una emulsión fotográfica expuesta sobre el papel. (Ilustración diseñada por George V. Kelvin.)



proceso de la clonación permitía producir experimentalmente grandes cantidades de un mismo gen de ratón, ya que todas las bacterias contenidas en una colonia llevaban insertado el mismo ADN de ratón. Hibridando el ADN con ARNm total de varios tipos celulares diferentes, identificamos algunos genes que determinaban proteínas específicas del hígado (tales ADN hibridaban sólo con ARNm procedente de células hepáticas) y genes que determinaban proteínas "comunes" (que hibridaban con ARNm de todos los tipos celulares).

De estos experimentos se deducía que los ARNm para proteínas específicas de hígado sólo se fabricaban en células hepáticas. Quedaba por resolver si ello ocurría porque en las demás células los transcritos no maduraban o porque los genes no llegaban a transcribirse. Para averiguarlo, recogimos núcleos procedentes de células de cerebro, riñón o hígado y dejamos que sintetizaran ARN a partir de precursores radiactivos durante un breve período de tiempo (unos 10 minutos). Cuando aislamos los transcritos de ARN de cada uno de los tipos de núcleo sabíamos que los marcados radiactivamente estaban recién sintetizados y, por tanto, sin madurar. Si en los núcleos de cerebro y riñón se transcribiesen genes específicos del hígado, el ARN marcado procedente de estos núcleos portaría transcritos específicos de hígado. Sin embargo, cuando los extractos se expusieron a los diferentes ADN clonados, el ARN de cerebro y riñón sólo hibridó con los ADN que de-

9. LA EVOLUCION PRECELULAR pudo requerir empalmes en el ARN. La "sopa primordial" contenía probablemente nucleótidos y aminoácidos (*1*). En las condiciones primordiales, se pudieron formar cadenas de ARN de 30 o más nucleótidos mediante síntesis espontánea y copiando cadenas más cortas (*2*). Algunas secuencias de ARN podían contener información para sintetizar secuencias de aminoácidos, constituyéndose así "dominios" de péptidos (*3*). Las regiones informativas o exones (*color*) podían haber estado separadas por intrones (*gris*). El mecanismo para empalmar segmentos de ARN, que puede actuar en ausencia de proteínas, pudo surgir para unir exones que juntos determinasen una proteína más útil que los dominios peptídicos sueltos (*4*). Una proteína temprana similar a la moderna enzima retrotranscriptasa pudo, copiando ARN en ADN, efectuar el cambio de un sistema genético basado en el ARN a otro basado en ADN (*5*). El antecesor común de todas las células, el progenota, contenía ADN con abundantes intrones, así como ribosomas para traducir la información genética en proteínas (*6*), según el código genético actual. Los modernos eucariotas procederían de una fusión entre un núcleo ancestral y eubacterias, quienes suministraron las mitocondrias y cloroplastos. Según este punto de vista, los genomas bacterianos se encuentran relativamente libres de intrones porque tienen muchas más generaciones de evolución que los eucariotas.

terminaban proteínas de las llamadas comunes, y no con los específicos de hígado. Obviamente, los genes para las 12 proteínas hepáticas que examinamos no se estaban transcribiendo en el cerebro ni en el riñón.

Los resultados obtenidos tras muchos experimentos similares nos facultan para generalizar el proceso. En organismos multicelulares, la mayoría de las decisiones que se toman específicamente en un tejido, y que están encaminadas a producir ciertas proteínas y no otras, se llevan a cabo en el nivel transcripcional. Docenas de laboratorios tratan de averiguar con sus investigaciones cómo se toman tales decisiones. Hasta la fecha no se ha encontrado una respuesta válida.

Aunque la maduración del ARN no constituya uno de los fundamentos principales de la diferenciación celular, en todas las células se produce alguna forma de maduración y, en la mayoría de los casos, es esencial para su función. Podríamos preguntarnos sobre la historia evolutiva de este mecanismo. Procesos de corte y empalme de transcritos primarios de ARNm se acaban de observar en bacterias, aunque son mucho menos frecuentes que en eucariotas. Las bacterias contienen muy pocos intrones. Hasta hayer mismo, la mayoría de los biólogos creían que las bacterias, debido a su simplicidad, debían guardar una relación muy estrecha con las células más primitivas; pensaban, asimismo, que los eucariotas evolucionaron a partir de esos procariotas ancestrales. En consecuencia, muchos investigadores consideraron a los intrones como entes complejos introducidos relativamente tarde en el curso de la evolución.

Dos líneas experimentales distintas contradicen este punto de vista. En primer lugar, hay buenas razones para cuestionar que las bacterias sean evolutivamente anteriores a los eucariotas. En segundo lugar, pruebas experimentales sugieren que la maduración del ARN, incluidos los procesos de corte y empalme, pueden ocurrir en ausencia de las proteínas que catalizan estas reacciones en las células modernas. Es más, tales reacciones podrían haber ocurrido en un ambiente precelular.

Las pruebas que contradicen la creencia de que las bacterias son los organismos más antiguos proceden de los trabajos de Carl R. Woese y sus colaboradores, de la Universidad de Illinois en Urbana-Champaign. Para establecer linajes celulares, el grupo de Woese decidió comparar las secuencias de nucleótidos de los ARN ribosómicos de muchos organismos. (Se eligió el ARN ribosómico porque hay formas muy parecidas de los ribosomas en todos los organismos. Se pensaba, por tanto, que pudieran ser estructuras presentes ya en las células primordiales.) Con sorpresa, los investigadores encontraron que un pequeño grupo de bacterias, con un metabolismo poco usual, no encajaba en el esquema de linajes trazado para las bacterias normales. Este grupo, denominado archibacterias, no parecía quedar más cerca de las bacterias normales (eubacterias) que de los eucariotas. Atendiendo a las secuencias de ARNr, los eucariotas formaban también un grupo distinto, que abarcaba un amplio rango de organismos, de la levadura al hombre.

Como los tres grupos comparten el mismo código genético, Woese los consideró representantes de tres líneas distintas descendientes de un antecesor común, que él llamó progenota. Las eubacterias y archibacterias pudieron haber evolucionado directamente del progenota. Por otra parte, casi con toda seguridad los eucariotas modernos son el producto de la fusión de un eucariota ancestral con dos tipos de eubacterias. El eucariota ancestral dio origen al núcleo moderno y las bacterias a las mitocondrias y cloroplastos. Las mitocondrias se encuentran en todos los eucariotas y son los orgánulos productores de energía. Los cloroplastos se hallan en las plantas y son los orgánulos fotosintéticos. (Tanto mitocondrias como cloroplastos contienen su propio ADN y ARN. Las secuencias de los ARNr de las mitocondrias son, además, similares a las de las bacterias rojas del azufre, en tanto que el ARNr de los cloroplastos es muy parecido al de las cianobacterias.) De acuerdo con Woese, por tanto, el núcleo eucariótico sería tan antiguo como las bacterias. Por darse en el núcleo la maduración del ARN, no hay razón para suponer que el proceso de maduración tardó mucho tiempo en aparecer.

Pudo haber existido incluso antes de que apareciesen los progenotas. Durante años, muchos investigadores han venido considerando el ARN como el primer biopolímero. Al igual que el ADN, es capaz de almacenar información (aunque no en la forma segura del ADN) y, a diferencia de éste, interviene de una manera decisiva en el desciframiento de la información almacenada. Estudios recientes sobre aspectos químicos del ARN prestan un sólido apoyo a la idea de que el ARN fue primero. Leslie E. Orgel y sus colaboradores, del Instituto Salk, han demostrado que en un ambiente con una

alta concentración de sales y nucleótidos se sintetizan espontáneamente oligonucleótidos de ARN. Un ambiente parecido pudo existir en la Tierra primitiva. Mediante emparejamiento de bases complementarias también pueden formarse espontáneamente cadenas de ARN que sean copias de otras moléculas de ARN. Ambas reacciones son lentas, pero tienen lugar en ausencia de enzimas o cualquier otra proteína. Es muy posible, por tanto, que la "sopa primordial" contuviese cadenas cortas de ARN junto con nucleótidos y aminoácidos sueltos. Ni el ADN ni las células polimerizan con la facilidad del ARN.

Las reacciones esenciales del proceso de maduración del ARN (los cortes y empalmes por sitios específicos) pueden ocurrir también en ausencia de proteínas. Sidney Altman y sus colaboradores, en Yale, han observado un ejemplo de ello en *E. coli*. En esta bacteria, una enzima que contiene una pequeña molécula de ARN corta cierto precursor de ARNt. El grupo de Altman ha encontrado, sin embargo, que la pequeña molécula de ARN puede, por sí sola, cortar correctamente al precursor sin la ayuda de la enzima.

Mayor sorpresa constituye quizá que los empalmes de trozos de ARN se produzcan en ausencia de proteína. Thomas R. Cech y sus colaboradores, de la Universidad de Colorado en Boulder, lograron describir este fenómeno en el protozoo *Tetrahymena pyriformis*, que no necesita proteínas para eliminar un intrón de sus transcritos de ARNr y unir los dos exones. Este proceso se realiza también en ausencia de proteínas en el caso del ARNr mitocondrial del hongo *Neurospora crassa*. Las secuencias de los dos ARNr autónomos para el proceso de corte y empalme son notablemente parecidas.

Si suponemos que las primeras moléculas que almacenaban información, o genes, fueron moléculas de ARN, los procesos de corte y empalme en el ARN pudieron intervenir de una manera destacada en la evolución precelular. Cómo pudo el ARN determinar alguna vez secuencias de aminoácidos sigue siendo un misterio. Parece poco probable, no obstante, que la información necesaria para ello estuviese en forma de largas e ininterrumpidas secuencias nucleotídicas en las cadenas de ARN generadas espontáneamente. Parece más plausible que secuencias cortas de ARN, determinando cadenas peptídicas primitivas, aunque funcionales, estuviesen separadas por secuencias carentes de información, lo que llamamos intrones.

La posición de exones e intrones en los genes modernos corrobora la hipótesis. En muchos genes, piénsese en los que determinan hemoglobina, anticuerpos (inmunoglobulinas) y ciertas enzimas, cada exón determina un "dominio" de la molécula de proteína, que es reconocido como unidad funcional. Parece improbable que la introducción aleatoria de intrones a lo largo de la evolución haya producido esta división tan poco aleatoria de los genes. Es más plausible suponer que los intrones estaban allí desde un principio. En cuyo caso, la automaduración del ARN pudo haberse utilizado, antes incluso de que las célula evolucionaran, para eliminar intrones y unir regiones responsables de la síntesis de pequeños péptidos, que, juntas ya, determinarían proteínas más largas y útiles.

¿Cómo evolucionó el ADN? La retrotranscriptasa fue descubierta en virus, en 1970, por Howard M. Temin, de la Universidad de Wisconsin en Madison, y David Baltimore, del MIT. Se han encontrado pruebas indirectas de la presencia de una enzima similar en todas las células eucarióticas, lo que sugiere que la retrotranscripción enzimáticamente catalizada del ARN en ADN es bastante antigua. La existencia de este proceso puede explicar la transferencia evolutiva de la función de almacenar información desde el ARN al ADN, más estable, cambio que fue condición indispensable para que surgieran células dotadas de capacidad de autorreproducción. Gracias a la retrotranscripción pudo haberse conservado en el ADN la distribución de intrones y exones presente en el ARN.

Queda por esclarecer si el progenota, antecesor de todas las células, era una célula propiamente dicha o una forma intermedia. Ciertamente debía poseer ADN, probablemente salpicado de intrones. Entra también en el campo de lo verosímil que los genes de las bacterias y archibacterias más primitivas tuviesen un número considerable de intrones. Tras innumerables generaciones de evolución las bacterias han eliminado las secuencias no informativas de su ADN. Han evolucionado hasta convertirse en máquinas perfeccionadas de fabricar proteínas. El ADN de los eucariotas, incluidos los seres humanos, ha seguido un curso evolutivo más lento. Con nuestros genes "desordenados" y nuestra dependencia del mecanismo de empalmar ARN para darles sentido, podemos estar realmente más cerca que las bacterias del antepasado primitivo de todos los seres vivos.

Ciencia y sociedad

Nobel de fisiología y medicina 1985

El premio Nobel de fisiología y medicina de 1985 se ha concedido a Michael S. Brown y Josep L. Goldstein por unos trabajos que "han revolucionado nuestro conocimiento del metabolismo del colesterol y el tratamiento de enfermedades causadas por niveles anormalmente elevados de colesterol en sangre", según reconoció el Comité otorgador. (En enero de este año, *Investigación y Ciencia* publicó un artículo suyo donde exponían la labor desarrollada hasta entonces.)

Brown y Goldstein son profesores de la Facultad de Medicina de la Universidad de Texas en Dallas, donde han desarrollado conjuntamente todo el trabajo por el cual les han concedido el galardón. Brown se doctoró en medicina por la Universidad de Pennsylvania en 1966 y Goldstein por la de Texas en Dallas. Coincidieron en el Hospital General de Massachusetts de Boston, mientras realizaban los cursos de especialización clínica. Después de un período de investigación en otros centros, Brown y Goldstein volvieron a coincidir en la Facultad de Medicina de Texas en Dallas, llevando a cabo desde entonces todo su trabajo científico en una fructífera colaboración.

El colesterol es un lípido esencial para la vida. Es un componente fundamental de las membranas celulares, y a partir de él se sintetizan otros compuestos también importantes, como sales biliares y hormonas sexuales. Las células del organismo lo sacan de dos fuentes: de la propia síntesis celular, especialmente en el hígado; y, en segundo lugar, del colesterol que ingerimos con la dieta, y que circula por la sangre en partículas que se denominan lipoproteínas, una combinación de lípidos y proteínas. La más importante lipoproteína en su papel de transportador del colesterol es la denominada "lipoproteína de baja densidad" (LDL, por "low-density lipoprotein").

El trabajo fundamental de Brown y Goldstein ha sido el descubrimiento de un receptor localizado en la superficie exterior celular, que capta las partículas LDL de la sangre y las introduce en las células para su utilización. Cuando no existe este receptor por enfermedades géneticas u otros factores, el colesterol se acumula en la sangre, depositándose en las paredes arteriales y dando lugar a aterosclerosis.

Brown y Goldstein iniciaron sus investigaciones con un propósito: desentrañar la causa de una enfermedad genética denominada hipercolesterolemia familiar (HF); quienes la padecen presentan un nivel de colesterol sanguíneo muy elevado. De cada 500 personas, una suele contraer esta enfermedad de una forma heterozigota, con riesgo de infarto de miocardio hacia los 35 años. Si dos portadores de estos heterozigotos HF se casan, uno de cada cuatro de sus hijos será homozigoto HF, y sufrirá infartos de miocardio muy tempranos, a los tres o cuatro años.

Cuando en 1973 Brown y Goldstein estudiaban células de individuos normales y de individuos afectados de la enfermedad HF, descubrieron que en las membranas de las células normales había unas moléculas que captaban muy específicamente LDL y otras lipoproteínas relacionadas; y denominaron a dichas moléculas receptores de LDL. Por medio de los receptores de LDL, las células tomaban el colesterol que circulaba por la sangre en forma de LDL, no permitiendo su acumulación en las paredes de las arterias. Sin embargo, las células de los enfermos homozigotos HF no disponían de los receptores de LDL. Las células de los heterozigotos HF contaban con la mitad aproximada de los receptores de LDL de las células normales, lo que explicaba que las células de su organismo no capturasen el colesterol circulante por su sangre en forma de partículas LDL, en razón de la cual provocábase la acumulación de colesterol en las paredes arteriales, con el consiguiente desarrollo de aterosclerosis y ataques de infarto de miocardio en edades precoces.

Si tenemos en cuenta que, además de los enfermos HF, otro gran número de personas tienen niveles sanguíneos de colesterol anormalmente elevados, lo que da lugar a que la mitad de las muertes que se registran en Occidente sean producto de la aterosclerosis, entenderemos la extraordinaria importancia del descubrimiento de los receptores de LDL realizado por Brown y Goldstein. Dicho descubrimiento ha posibilitado, gracias sobre todo a los trabajos acometidos por ellos mismos, a un mejor conocimiento del metabolismo del colesterol, condición indispensable para prevenir la aterosclerosis.

Se están dando los primeros pasos en este sentido. Brown y Goldstein demostraron que una resina captadora de ácidos biliares (colestiramina) utilizada desde hace 20 años para rebajar los niveles sanguíneos de colesterol, producía su efecto aumentando el número de receptores de LDL en las células del hígado, que es el órgano que remueve mayor cantidad de colesterol de la sangre. Lo mismo pudieron comprobar con otro fármaco (mevinolina), que en estos momentos se está estudiando en pruebas clínicas en Estados Unidos. Cuando administraron ambos fármacos simultáneamente a pacientes heterozigotos HF, sus niveles de LDL en sangre descendieron en un cincuenta por ciento, quedando dentro de los valores normales; debíase ello al aumento del número de receptores de LDL producidos por el gen normal de dichos individuos heterozigotos HF.

Los homozigotos HF no pueden responder a este tratamiento por carecer de genes normales, capaces de producir receptores de LDL. De los trabajos de Brown, Goldstein y de otros investigadores deducíase que la carencia de receptores podría corregirse parcialmente si al enfermo se le transplantase el hígado de un donante normal. Gracias a ese avance, una niña homozigota HF recibió el primer transplante simultáneo de hígado y corazón, en la Universidad de Pittsburgh (su corazón estaba debilitado por la enfermedad). Año y medio después de la operación, la paciente mantenía un nivel de colesterol doble del normal más o menos; antes de la operación, dicha concentración era de aproximadamente 10 veces el normal.

La importancia de las investigaciones de Brown y Goldstein va mucho más lejos, desde el punto de vista de la ciencia básica. Descubrieron cómo los receptores de LDL se acumulaban en depresiones de la membrana celular revestidas de una proteína (clatrina), a las que denominaron "hoyos revestidos" (*coated pits*). Después de su formación, esos hoyos se invaginan y se desprenden de la membrana plasmática, formando partículas rodeadas de una membrana (vesículas); a través de

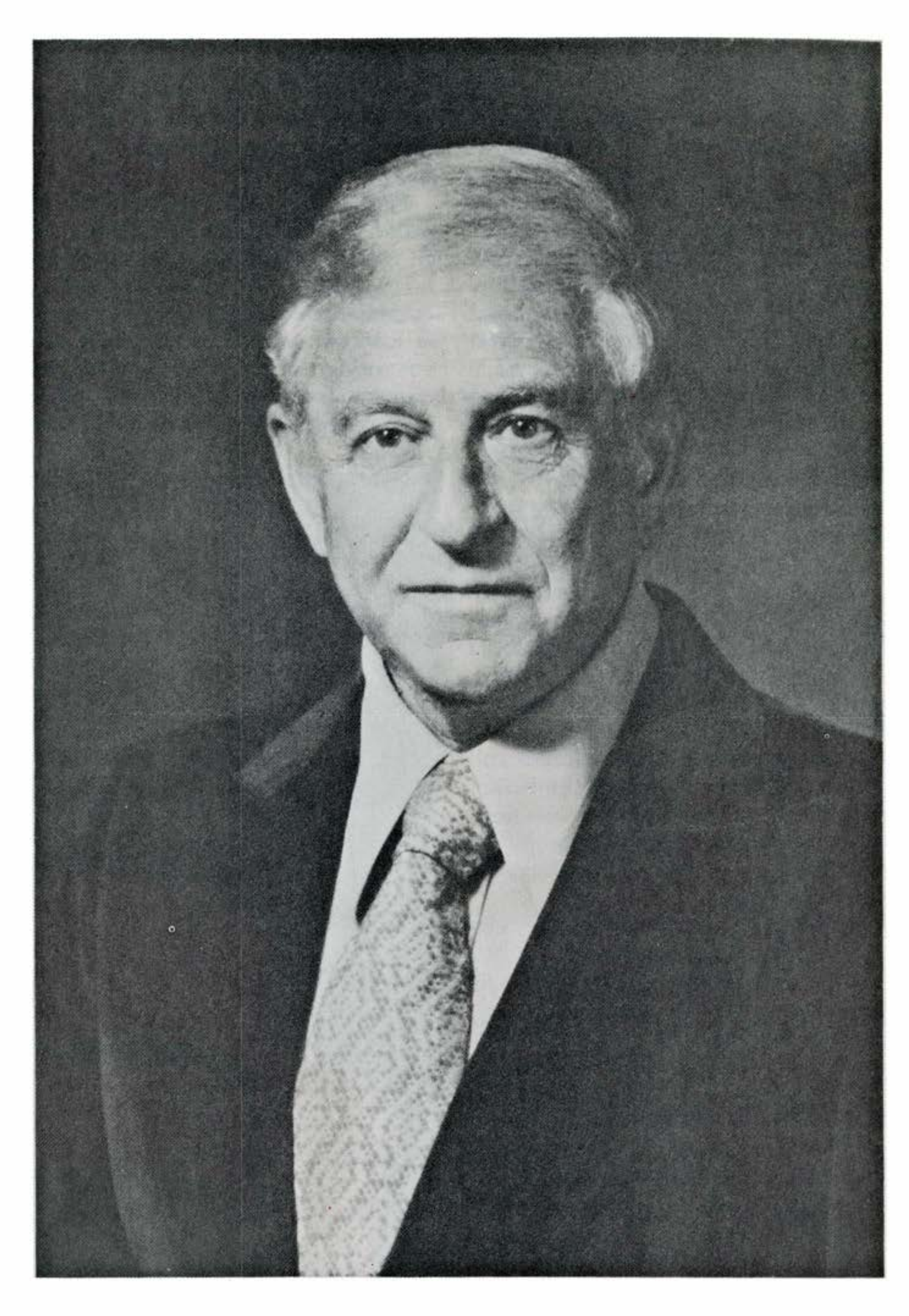
este mecanismo, cualquier partícula LDL unida a un receptor se transporta hasta el interior celular; y a continuación el receptor de LDL se recicla en la superficie celular para su posterior utilización. A este proceso Brown y Goldstein lo llamaron endocitosis mediada por receptor; más tarde se demostraría que se trataba de un mecanismo general por el que muchas macromoléculas, así la insulina y otras hormonas, y moléculas pequeñas, como hierro y otros metales, penetraban en la célula tras su captura por receptores específicos. [Véase explicado esto con cierto detalle en el artículo de Mark S. Bretscher: "Moléculas de la membrana celular", de este número monográfico.]

En los últimos años, Brown y Goldstein han aislado, utilizando técnicas de genética molecular, el gen del receptor de LDL, lo que ha permitido conocer exactamente dónde reside el defecto en el gen del receptor en algunos pacientes HF, y, por tanto, averiguar por qué sus receptores no son funcionales. Acaban de aislar también el gen de la enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol (HMG CoA reductasa), que reviste particular interés porque la producción de dicha enzima está disminuida por colesterol (regulación feedback). Si se lograra desentrañar esa regulación en el nivel génico, sería factible explorar la posibilidad de que defectos en ese gen explicaran algunos casos de hipercolesteremia no debidos a deficiencias en el gen del receptor de LDL. (Gregorio Gil Pujades.)

Nobel de economía 1985

Los premios Nobel de ciencias se suelen conceder a investigadores que han dedicado gran parte de su vida al estudio de materias muy específicas, alcanzando una elevada especialización. Esto no ocurre en las ciencias sociales, quizá por su relativa juventud, por la generalidad de sus métodos o, sobre todo, porque los fenómenos sociales están tan conectados entre sí que no es posible el especialista exclusivo. Así, en el campo de la economía, un estudioso del consumo debe entender también la inversión, los impuestos, la seguridad social, el gasto público, algo de demografía, teorías de la distribución de la renta y un largo etcétera.

Por ello, a un economista no le causa extrañeza que el curriculum del último premio Nobel ofrezca un amplio espectro de temas, que va desde el ahorro hasta el oligopolio, desde la macroeconomía keynesiana hasta la teoría de las finanzas y la de los inventarios. Este premio corona la labor de Franco Modigliani, nacido en Roma en 1918, doctorado en derecho en su ciudad natal en 1939, ciudadano norteamericano en la actualidad, que trabaja desde 1972 en el Instituto de Tecnología de Massachusetts (MIT). Premio esperado entre la profesión y, a mi juicio, merecido.



Franco Modigliani

En lo que sigue pasaré revista sucintamente a las principales aportaciones de Modigliani a la economía, sin ánimo de ser completo. Me centraré en los temas más innovadores de nuestro autor: la teoría del ahorro, sus teoremas financieros, su aportación a la macroeconomía moderna y su participación en los debates sobre la política de estabilización.

1. Lo que ha hecho más famoso a Modigliani es, sin duda, su *teoría del*

ahorro (o del consumo), apuntada en 1949, desarrollada en 1954 con R. Brumberg y completada luego con A. Ando. La idea de partida es muy sencilla: la gente toma sus decisiones de consumo (o ahorro) considerando no su situación en un momento del tiempo, sino las perspectivas de toda su vida futura. Típicamente, una familia empieza su andadura independientemente con bajos ingresos; más tarde, éstos crecen en el tiempo, para volver a reducirse (e incluso desaparecer) al final de la vida, con la jubilación. Pues bien, es el conjunto de esos ingresos lo que los sujetos tienen en cuenta al decidir su consumo de cada período (y, por tanto, su ahorro, es decir, la parte de renta que no gastan hoy para poder consumirla en el futuro). La teoría del ciclo de vida, como se la llama, pronostica, pues, que las familias jóvenes consumirán una parte elevada de su renta (e incluso desahorrarán, es decir, consumirán más de lo que permiten sus ingresos), las familias maduras tendrán un ahorro positivo, y los retirados volverán a desahorrar (porque, en definitiva, el ahorro a lo largo de la vida tiene como objetivo principal facilitar los recursos necesarios para el consumo en la época de retiro).

En el plano teórico, la versión elaborada por Modigliani implica que el consumo de un período es función de la renta de dicho período y de la riqueza acumulada por la familia (también de la recibida en herencia). En épocas en que los ingresos se reducen temporalmente (desempleo, enfermedad, etc.), el consumo se reduce también, pero menos que proporcionalmente, y es el ahorro el que se contrae más bruscamente; lo contrario ocurre cuando la renta aumenta.

La teoría del ciclo vital ha sido profusamente utilizada, y constituye actualmente el núcleo de nuestra concepción macroeconómica del ahorro y del consumo, junto con la teoría de la renta permanente, del también premio Nobel Milton Friedman, que tiene un gran parecido con la de Modigliani. Ha sido ampliada y corregida para introducir la incertidumbre, los impuestos, la seguridad social, etc., y ha sido contrastada empíricamente por muchos autores (por Modigliani mismo, repetidas veces) con resultados satisfactorios.

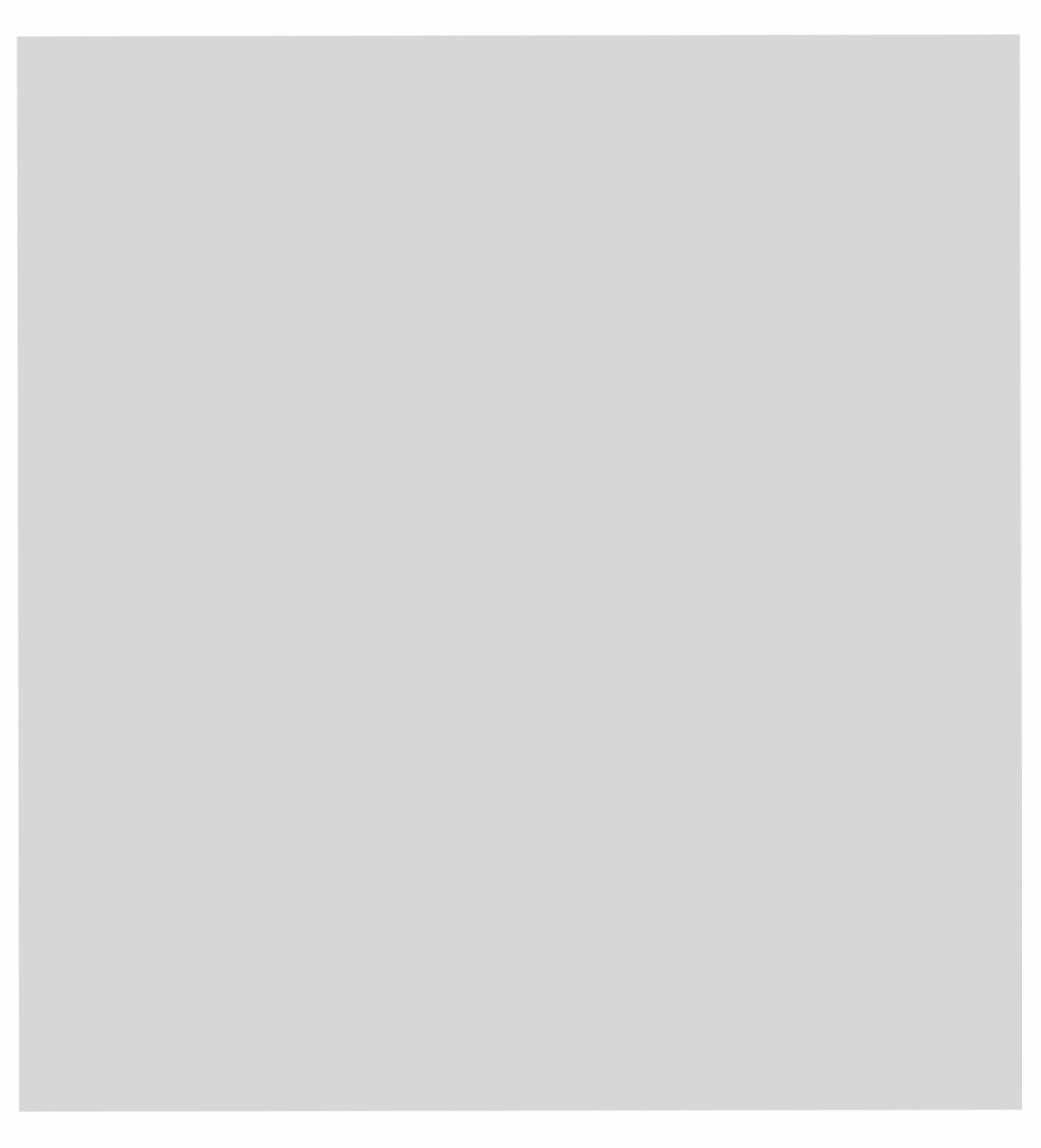
2. En el plano de las finanzas, son famosos los *teoremas de Modigliani y Miller*. Su formulación es muy sencilla: el coste de la financiación de una empresa es el mismo tanto si recurre a la emisión de acciones, como al endeudamiento (obligaciones o créditos) o a la retención de beneficios (en lugar de repartirlos como dividendos). Es decir, no existe una estructura financiera óptima.

Pero... esto parece claramente contrario a la experiencia de las empresas. El coste de una ampliación de capital no es el mismo que el de un crédito; ni es indiferente para los propietarios que la empresa crezca introduciendo nuevos socios, endeudándose con los bancos o reteniendo beneficios. Es verdad: pero la utilidad del teorema de Modigliani y Miller radica, precisamente, en identificar los supuestos bajo los cuales la neutralidad que ellos sostienen tiene lugar. Entre esos supuestos destaca la ausencia de impuestos sobre beneficios y la existencia de mercado de capitales perfectos. Una vez identificadas esas causas, las implicaciones del teorema para la gestión de las empresas y, sobre todo, para la elaboración de las políticas públicas son muy importantes.

3. La *macroeconomía moderna* arranca de *La Teoría general de la ocupación, el interés y el dinero*, de J. M. Keynes (1936), pero ya desde los últi-

mos años treinta empezó a ir más lejos de lo que su fundador pensó, cuando algunos de sus sucesores intentaron integrar su teoría con la de los autores anteriores (los "clásicos"). Iniciado el camino por el también premio Nobel J. R. Hicks, recibió también contribuciones importantes de Modigliani, que trabajó en la generalización de la *Teoría general*, estudió los efectos de un cambio en los supuestos keynesianos y profundizó en el papel de la preferencia por la liquidez en el modelo keynesiano. Con razón se le puede considerar, pues, uno de los padres de la "síntesis neoclásico-keynesiana" que, para bien o para mal, ha presidido nuestros manuales de macroeconomía hasta los años ochenta.

4. Quizá por su formación y por esos estudios de los años cuarenta, Modigliani ha sido siempre un continuador de Keynes, aunque su obra va más allá de la del maestro y, en ocasiones, pretenda sustituirla. Con todo, Modigliani siguen pensando hoy que la concepción keynesiana básica sigue siendo válida. Muchos de sus estudios de los últimos años han ido dirigidos a defender posturas keynesianas frente a los ataques de los "monetaristas", reivindicando el mensaje fundamental de la *Teoría general*: que la economía capitalista *necesita ser estabilizada* mediante políticas adecuadas, *puede ser estabilizada* y *debe serlo*. Al propio tiempo, ha contribuido a mejorar el arsenal de instrumentos estabilizadores (fiscales, monetarios, de tipo de cambio, de política de rentas, etc.), adaptándolos a las nuevas circunstancias (bien es verdad que obligado a ello, en parte, por las críticas de sus contrarios y por la evidencia de los hechos, no siempre favorable). (Antonio Argandoña.)



Proteínas

Son las moléculas determinadas por los genes. Las proteínas generan estructura y, en virtud de su unión selectiva con otras moléculas, elaboran los genes y el resto de la maquinaria que da soporte a la vida

Russell F. Doolittle

Si el ADN constituye un proyecto de vida, las proteínas son los ladrillos y el mortero. Sirven, además, de máquinas y herramientas en el montaje de la célula o el organismo, e incluso desempeñan las funciones de los albañiles, que llevan a cabo el propio trabajo de construcción. Nuestros genes proporcionan la información, pero *somos* nuestras proteínas.

Igual que el ADN, la proteína es un polímero lineal: una cadena de unidades enlazadas en una secuencia sin solución. En otros aspectos, sin embargo, los dos tipos de molécula difieren bastante. En términos generales, todas las moléculas de ADN presentan una estructura semejante y desempeñan la misma función (la de archivo genético). Las proteínas, por el contrario, se pliegan en una notable diversidad de formas tridimensionales, que les proporcionan una correspondiente variedad de funciones. Actúan de componentes estructurales, de mensajeros y de receptores de mensajeros, de marcadores de la identidad individual y de armas que atacan las células que presentan marcadores ajenos. Algunas proteínas se unen al ADN y regulan la expresión de los genes; otras participan en la replicación, la transcripción y la traducción de la información genética. Quizá las proteínas más importantes sean las enzimas, catalizadores que determinan el ritmo y el rumbo de toda la bioquímica.

Uno de los objetivos principales en el estudio de las proteínas ha sido descifrar su estructura y, con ello, descubrir cómo funcionan. Un análisis estructural completo constituye una empresa laboriosa, por lo que, hasta ahora, los bioquímicos sólo han alcanzado a comprender en profundidad una pequeña fracción de las proteínas conocidas. Ello no obstante, se han revelado algunos principios generales: se admite hoy la existencia de subestructuras compartidas por diversas proteínas, que probablemente desempeñen funciones similares en muchas de ellas. El mismo interés presenta la cuestión de cómo han evolucionado y se han diversificado los millares de proteínas de cualquier organismo. La existencia de subestructuras compartidas es indicio de una evolución compleja. No se trata, sencillamente, de que una proteína se modifique y dé origen a otra, sino de que, de algún modo, deben intercambiarse fragmentos de información genética y después expresarse en muchas proteínas.

En toda la diversidad funcional de las proteínas se advierte un denominador común: en su gran mayoría, las proteínas funcionan por unión selectiva a moléculas. En el caso de una proteína estructural, la unión suele enlazar moléculas idénticas: se agregan muchos ejemplares de la misma proteína para originar una estructura de mayor tamaño, así una fibra, una hoja o un túbulo. Otras proteínas muestran afinidad por moléculas distintas. Los anticuerpos, por ejemplo, se unen a antígenos específicos; la hemoglobina capta oxígeno en los pulmones y luego lo libera en los tejidos periféricos; los reguladores de la expresión génica se unen a bases nucleotídicas dispuestas de forma específica en el ADN. Las proteínas de receptores insertos en la membrana celular reconocen moléculas mensajeras (como las hormonas y los neurotransmisores) que a su vez pueden ser proteínas dotadas de afinidad específica por los receptores. Prácticamente todas las actividades de las proteínas se explican en términos de ese enlace químico selectivo.

La unión de una molécula con la proteína que la reconoce no es fija, o permanente. Está gobernada por un equilibrio dinámico en el que las moléculas se unen y liberan continuamente. En cualquier instante, el porcentaje de moléculas unidas depende de las cantidades relativas de las dos sustancias y de la fuerza de la asociación entre ellas. La fuerza de la unión depende, a su vez, de lo bien que encajen las dos moléculas, tanto geométricamente como en lo referente a sus interacciones locales específicas, así la atracción o repulsión electrostática entre regiones cargadas.

Las enzimas, en este aspecto, se comportan en buena medida como el resto de las proteínas. La enzima reconoce una molécula específica (el denominado sustrato) y se une a él en equilibrio dinámico: lo que distingue a una enzima es que puede provocar algún cambio químico en el sustrato al que se ha unido. El cambio supone, por lo general, la formación o rotura de un enlace químico covalente: puede que el sustrato se parta en dos, se le adicione un grupo químico o, simplemente, se altere la disposición de sus enlaces.

En el mecanismo de la acción enzimática suelen distinguirse tres etapas. Primero, el sustrato se une a la enzima;

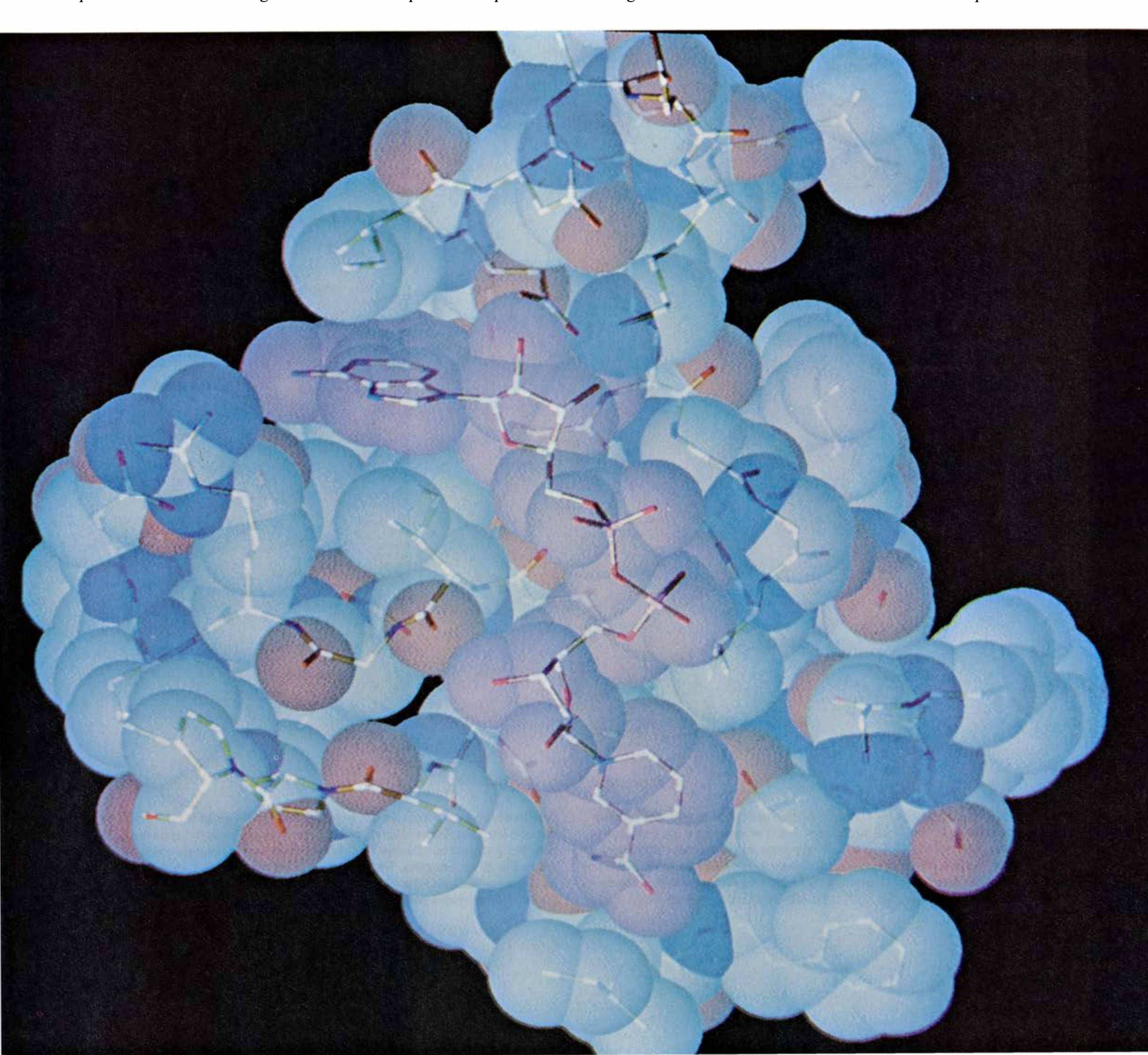
1. SITIO DE UNION DE LA PROTEINA, estructura emblemática del mecanismo principal del que se vale ésta en su función bioquímica: el establecimiento de una asociación, intensa pero generalmente breve, con otra molécula. La proteína es la alcohol deshidrogenasa, enzima del hígado que convierte el alcohol etílico en acetaldehído. Los átomos de carbono de la estructura proteica son blancos, los de oxígeno rojos y, los de nitrógeno, azules. Los átomos de color púrpura constituyen la molécula del dinucleótido de niacinamida y adenina (NAD), coenzima que toma parte en la reacción catalizada recibiendo un ion hidrógeno que se extrae a una molécula de alcohol. (El alcohol se une a un centro situado en otra parte de la proteína.) La molécula de NAD encaja de forma precisa en una hendidura de la superficie de la proteína, y se mantiene en ella por atracción electrostática. Muchas proteínas a las que se une el NAD y coenzimas emparentadas con él contienen un dominio de estructura similar. Se trata del denominado plegamiento de monucleótido, probablemente una de las unidades estructurales más antiguas de la evolución de las proteínas. Esta imagen, generada por ordenador, así como las que aparecen en las figuras 5 y 6, son obra de Jane M. Burridge, de la IBM.

luego, se produce la reacción química y, por fin, se libera el sustrato alterado. Las tres etapas son reversibles. Si la molécula *X* se une a la enzima y se convierte en la molécula *Y*, también se puede unir *Y* a esa misma enzima para convertirse en *X*. Son múltiples los cursos que puede seguir la reacción. Una molécula de *X* o de *Y* puede unirse a la enzima y liberarse antes de que se produzca ningún cambio en ella; o puede ocurrir que una molécula de *X* se convierta en *Y*, para luego transformarse de nuevo en *X* sin haberse soltado de la enzima, etcétera.

Debe subrayarse que la enzima no determina, de suyo, el sentido de la reacción. La proporción en que se hallen *X* e *Y* en el equilibrio depende de consideraciones termodinámicas; la proporción favorecida es la que hace que sea mínima la magnitud denominada energía libre. (A grandes rasgos, la energía libre de un sistema es igual a su energía menos su entropía, o desorden.) La enzima simplemente acelera la consecución del equilibrio. Con todo, una enzima puede controlar eficazmente el rumbo de un proceso bioquímico. En ausencia de enzimas, la mayoría de las reacciones bioquímicas son extremadamente lentas; la enzima apropiada puede aumentar su velocidad en un factor de un millón, o más. Aun cuando la enzima no influye en que se convierta mayor o menor cantidad de *X* en *Y*, o viceversa, determina si tiene lugar o no la conversión.

La enzima acelera la reacción reduciendo una barrera de energía. Incluso cuando una reacción sea termodinámicamente favorable, es decir, los productos posean una energía libre inferior a los reaccionantes, puede darse un estado intermedio con una energía libre más alta. La enzima tiende a suavizar esa colina del camino de la reacción. El mecanismo varía de unos casos a otros. Algunas enzimas sólo proporcionan un ambiente diferente al del medio acuoso o ponen en estrecho contacto a los reactivos. Otras enzimas desempeñan un papel más activo, añadiendo o quitando un protón, deformando los enlaces en la molécula del sustrato o incluso formando enlaces covalentes transitorios entre el sustrato y alguna parte de la propia enzima. Ciertas enzimas reciben la ayuda de moléculas auxiliares, las denominadas coenzimas. Se unen éstas a un centro específico en la proteína y aportan funciones químicas de las que carece la enzima.

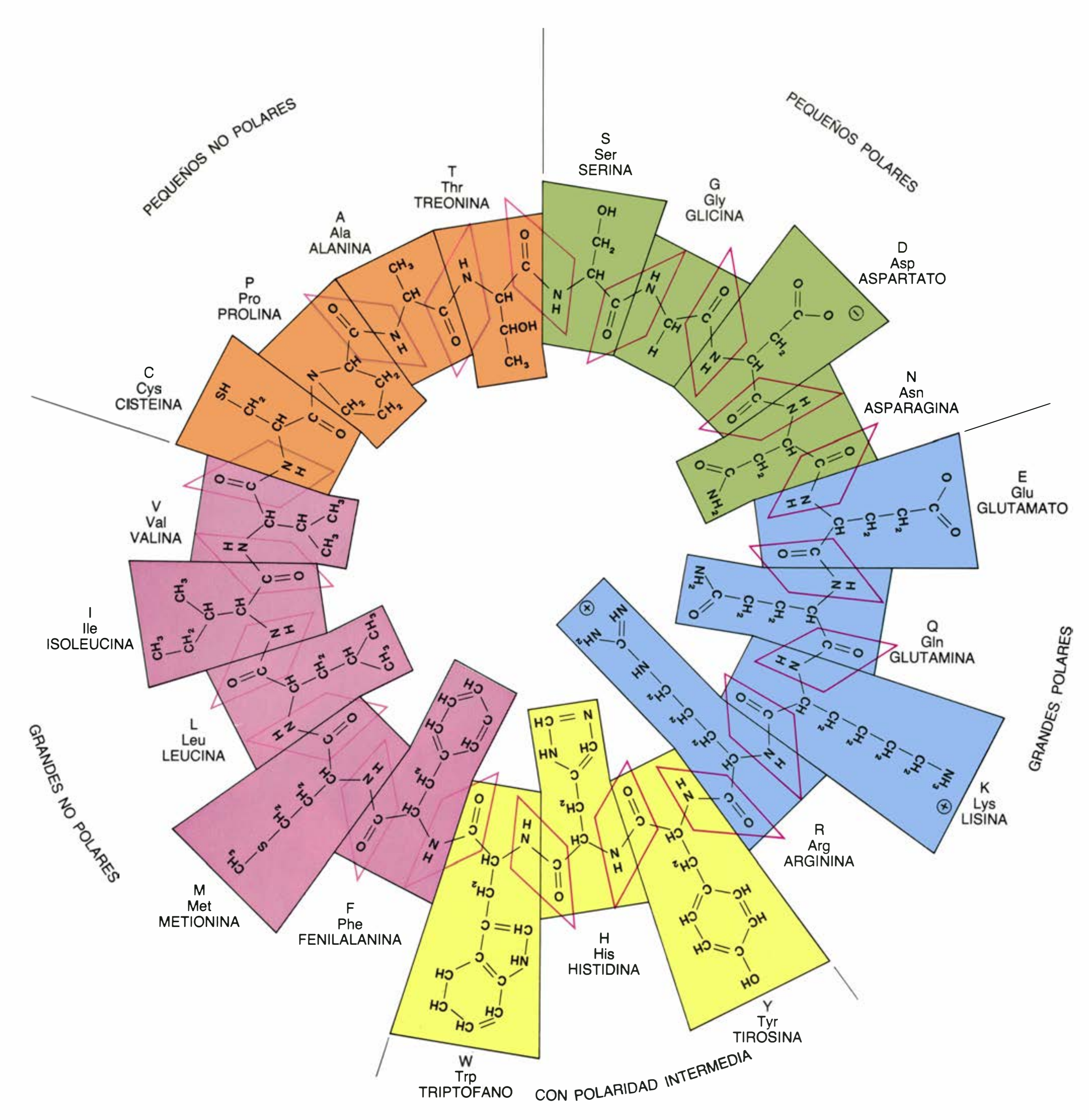
Gracias a las reacciones que catali-



zan se han identificado ya más de 2000 enzimas. Todas deben presentar una estructura diferente; en otras palabras, existen más de 2000 formas proteicas capaces de reconocer moléculas específicas. ¿Cómo se generan? El "alfabeto" a partir del cual se elaboran las proteínas lo componen los 20 aminoácidos que puede especificar el código genético; cada proteína es una secuencia de aminoácidos obtenida con ese abecedario. Las propiedades físicas y químicas de una molécula proteica dependen del plegamiento de la cadena de aminoácidos en el espacio tridimensional.

Toda la información precisa para definir la estructura en tres dimensiones de una proteína reside en su secuencia de aminoácidos. A medida que se construye la cadena en el ribosoma, se pliega en la configuración que minimiza la energía libre; en otras palabras, la cadena asume la conformación más "cómoda". En principio, si se conocieran todas las fuerzas que actúan sobre los miles de átomos de la proteína y sobre las moléculas de disolvente que la rodean podría predecirse la estructura en tres dimensiones a partir de la composición en aminoácidos. Este tipo de cálculo no resulta aún factible.

Los 20 aminoácidos están construi-



2. VEINTE AMINOACIDOS especifica el código genético; se trata de los componentes elementales de todas las proteínas. Aquí se muestran unidos cabeza con cola para formar un anillo (que no corresponde a la estructura de ninguna proteína real) y se indican sus abreviaturas de tres letras y de una letra. En esta disposición, los aminoácidos dotados de propiedades químicas similares se han colocado en la misma porción del anillo. La clasificación aproximada en cinco grupos se basa en el tamaño de la cadena lateral del aminoácido y en el grado de su polarización. (Una molécula polar tiene regiones separadas de carga eléctrica positiva y negativa.) Dichos factores ejercen una influencia decisiva en el plegamiento de la proteína. En la evolución de los péptidos, una forma mutante tiene mayor probabilidad de resultar aceptada si se sustituye un aminoácido por otro de propiedades similares, es decir, por uno que esté cerca de él en el anillo.

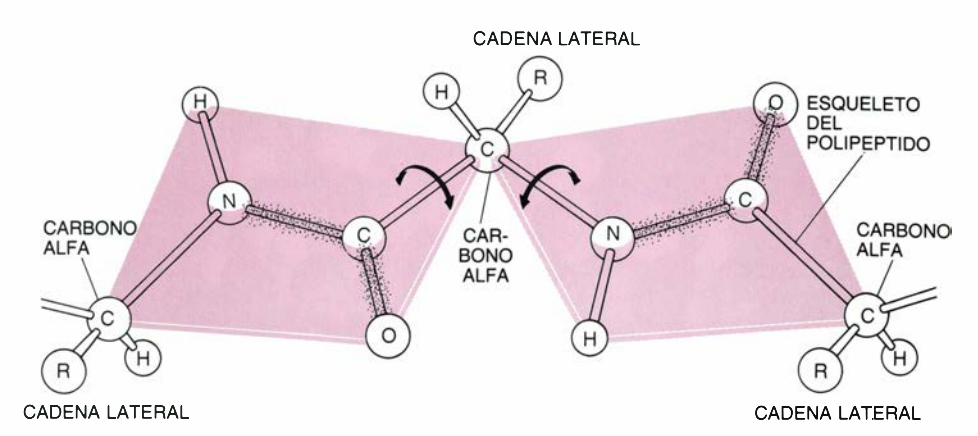
dos sobre un plan común. Tienen un grupo amino (NH_2) en un extremo y un grupo de ácido carboxílico (COOH) en el otro; ambos grupos están enlazados a un átomo de carbono central, llamado carbono alfa. También están enlazados al carbono alfa un átomo de hidrógeno y un cuarto grupo, la denominada cadena lateral. Los aminoácidos sólo difieren en la naturaleza de su cadena lateral.

El esqueleto de la proteína se construye uniendo, cabeza con cola, los aminoácidos: el grupo amino de una unidad se enlaza al grupo carboxílico de la siguiente. La fusión se logra eliminando una molécula de agua, para formar la estructura –CO–NH–. El enlace carbono-nitrógeno formado de esta manera se llama enlace peptídico, y la cadena proteínica recibe el nombre de polipéptido.

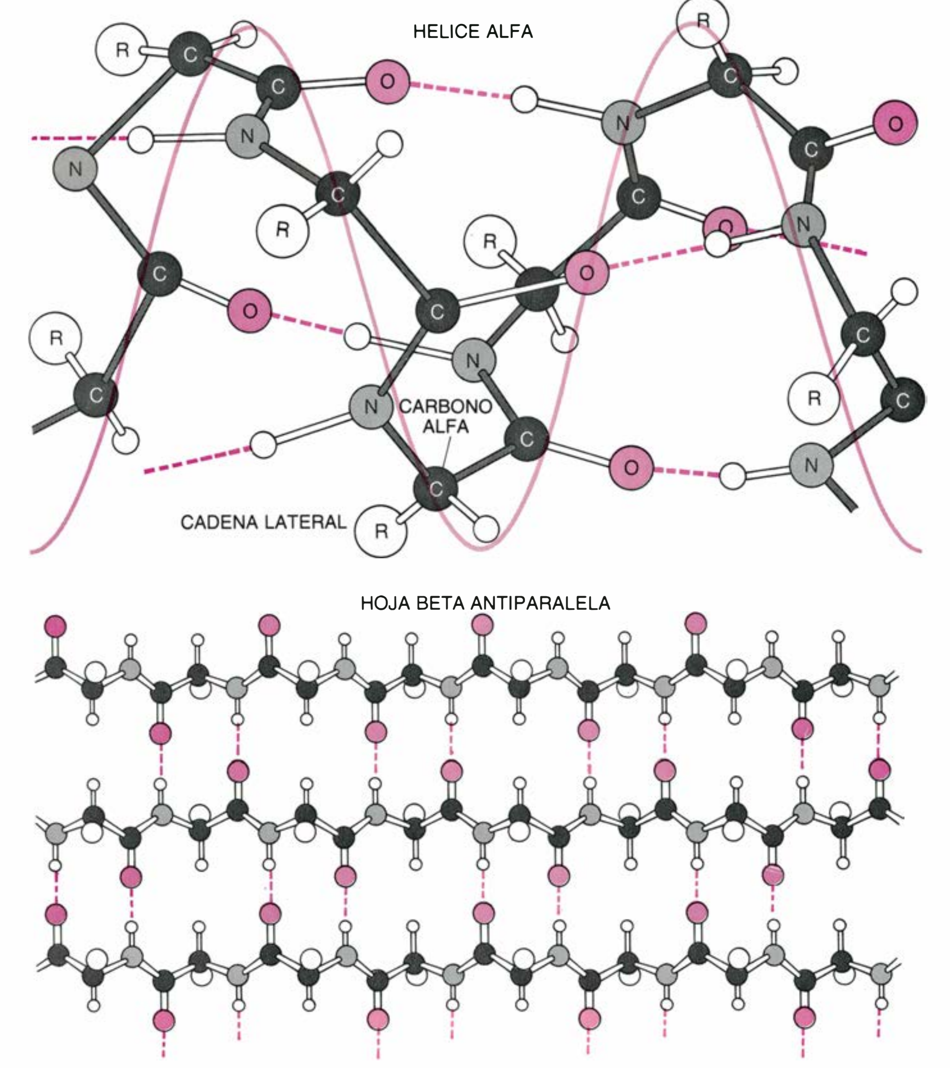
Las propiedades del enlace peptídico imponen ciertas restricciones en el plegamiento de la proteína. Los electrones compartidos entre los átomos de oxígeno, carbono y nitrógeno proporcionan al enlace rigidez frente a la torsión. De ese modo, cada unidad de enlace peptídico se encuentra en un plano, con lo que la cadena tiene que plegarse casi exclusivamente por medio de rotaciones de los enlaces establecidos con carbonos alfa. El esqueleto polipeptídico de la cadena es más una cadena articulada de placas planas que un rosario de cuentas flexible.

Las propiedades de las cadenas laterales ejercen su principal influencia sobre el plegamiento de la proteína. Las interacciones de una cadena lateral con otra, y con las moléculas del medio, pueden obligar a la cadena polipeptídica a plegarse en un glóbulo compacto, adoptando una forma estable y específica.

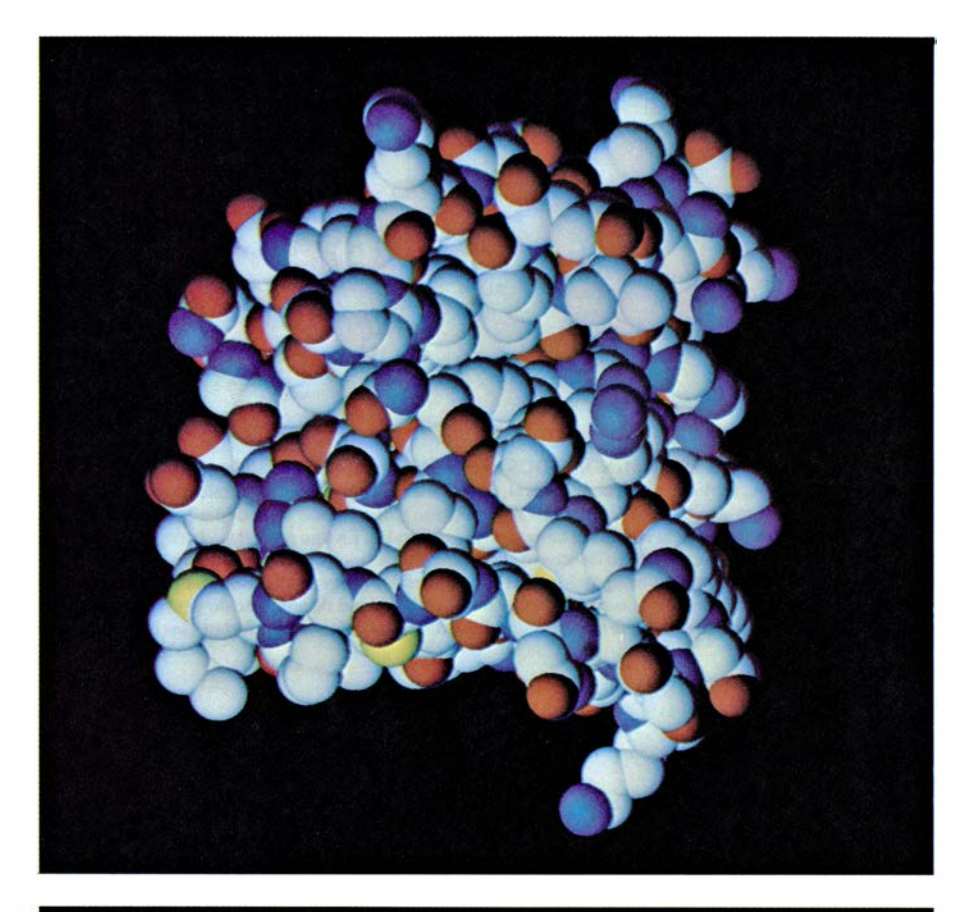
Algunos de los aminoácidos son moléculas polares: aunque, en conjunto, sean eléctricamente neutros, presentan concentraciones localizadas de carga positiva y negativa. La presencia de átomos de oxígeno o nitrógeno provoca la polarización, debido a su fuerte afinidad por los electrones. Unos pocos aminoácidos no sólo son polares, sino que llevan una carga eléctrica neta; en otras palabras, en condiciones fisiológicas están ionizados. Otras cadenas laterales (generalmente las constituidas sólo por carbono e hidrógeno) no son polares. Existe una fuerte tendencia en las cadenas laterales polares a buscar un ambiente polar y, en las no polares, a segregarse en regiones no polares. El

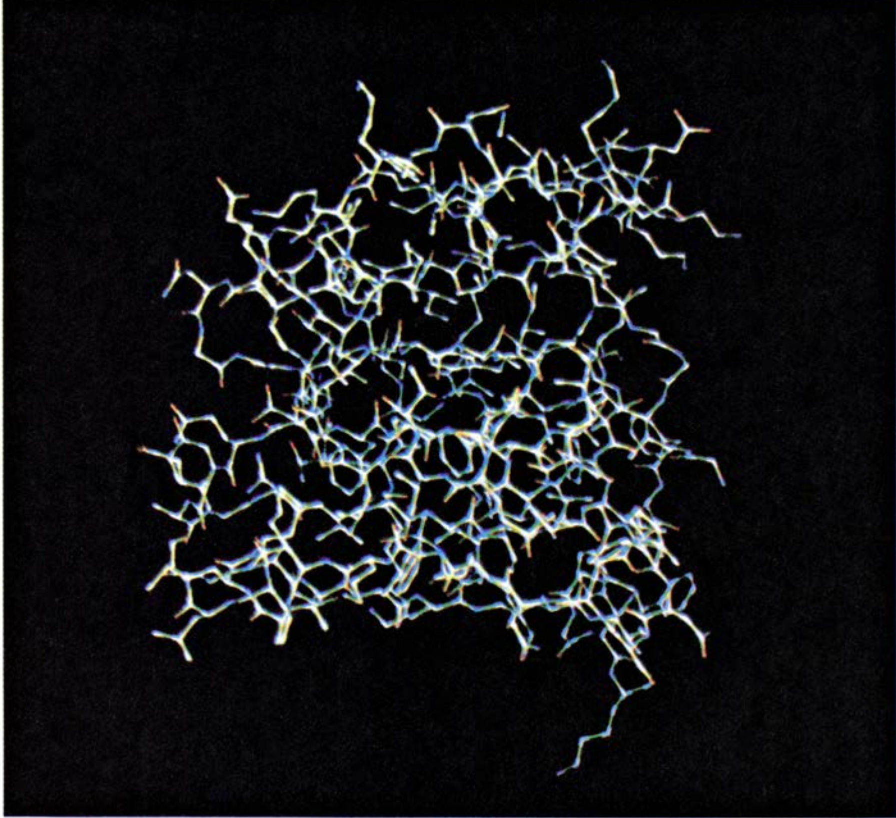


3. LA ESTRUCTURA DE LOS AMINOACIDOS impone restricciones al plegamiento de la proteína. En un aminoácido aislado, al átomo de carbono central, o alfa, se unen cuatro grupos químicos: un grupo amino (NH_3), un grupo carboxílico (COOH), un átomo de hidrógeno y una cadena lateral (designada por *R*). Los 20 aminoácidos sólo difieren en la identidad de sus cadenas laterales. En una proteína, el grupo amino de un aminoácido se une al grupo carboxílico de otro (con pérdida de una molécula de agua), con lo que se forma un enlace peptídico. Los electrones compartidos entre los átomos de nitrógeno, carbono y oxígeno determinan que el enlace oponga resistencia a la torsión, de modo que cada unidad de aminoácido se sitúe en un plano rígido. La proteína sólo puede plegarse por rotación alrededor de los enlaces que afectan a los carbonos alfa.



4. HELICE ALFA Y HOJA BETA (o plegamiento en beta) constituyen las unidades estructurales comunes de las moléculas de proteína. La secuencia de aminoácidos de una proteína se denomina estructura primaria: a medida que se sintetiza la cadena, sus regiones van plegándose espontáneamente en hélices alfa y hojas beta, que constituyen la estructura secundaria; a su vez, las hélices y hojas se ensamblan para crear la estructura terciaria. Tanto la hélice alfa como la hoja beta se encuentran estabilizadas por enlaces de hidrógeno (*líneas de trazos en color*) en los que un hidrógeno establece un puente entre átomos de oxígeno o nitrógeno.





5. CONFORMACION GLOBAL del dominio de unión con la coenzima de la alcohol deshidrogenasa, mostrada en dos representaciones gráficas. El modelo de espacio relleno (*imagen superior*) subraya la textura superficial de la molécula; el diagrama en esqueleto (*imagen inferior*) revela la estructura interna. En estas imágenes se muestran el esqueleto polipeptídico completo y todas las cadenas laterales de los aminoácidos, pero se omiten los átomos de hidrógeno. El plegamiento de la cadena parece ser una disposición desordenada al azar, aunque en realidad es muy específico: todas las moléculas de alcohol deshidrogenasa se pliegan exactamente de la misma forma. El dominio que constituye aproximadamente la mitad de la molécula se aprecia desde otro punto de vista en la figura 1. Aquí, el dominio de unión al NAD queda en la parte inferior.

agua, que es el medio donde se hallan inmersas la mayoría de las proteínas, es una sustancia fuertemente polar. Cuando una cadena lateral polar o cargada se proyecta en el medio acuoso, las moléculas de agua adoptan una disposición ordenada. Una cadena lateral no polar desorganiza esa alineación de cargas.

La principal consecuencia de esas interacciones es que la cadena proteica tiende a plegarse de forma que las cadenas polares se sitúen en la superficie expuesta y, las no polares, en el interior. La excepción a esa regla la proporcionan las proteínas insertas en las membranas celulares. La membrana está constituida por moléculas lipídicas no polares, y también el segmento de la proteína que pasa a su través lo forman principalmente aminoácidos no polares. Son los que anclan la proteína en la membrana.

La atracción electrostática entre una cadena lateral polar y el agua es una forma de enlace de hidrógeno en la que un átomo de hidrógeno actúa de puente entre átomos de oxígeno y nitrógeno cargados. Los enlaces de hidrógeno entre átomos de la misma proteína también contribuyen a estabilizar la estructura.

Los enlaces de hidrógeno son más débiles que los covalentes del esqueleto polipeptídico. Es más, los átomos unidos entre sí por enlaces de hidrógeno podrían igualmente establecerlos con moléculas de agua; la diferencia de energía entre ambas configuraciones es pequeña. No obstante, dado que se forman simultáneamente muchos enlaces de hidrógeno cuando se pliega la proteína, su aportación a la estabilidad de la estructura resulta considerable.

Existe aquí otro tipo de enlace capaz de reticular regiones de la estructura. El aminoácido cisteína posee un grupo tiol (SH) en el extremo de su cadena lateral. Si en la proteína hay dos residuos de cisteína pueden combinarse para formar un enlace covalente disulfuro (–S–S–). Este tipo de reticulación es mucho más fuerte que la que deriva de los enlaces de hidrógeno.

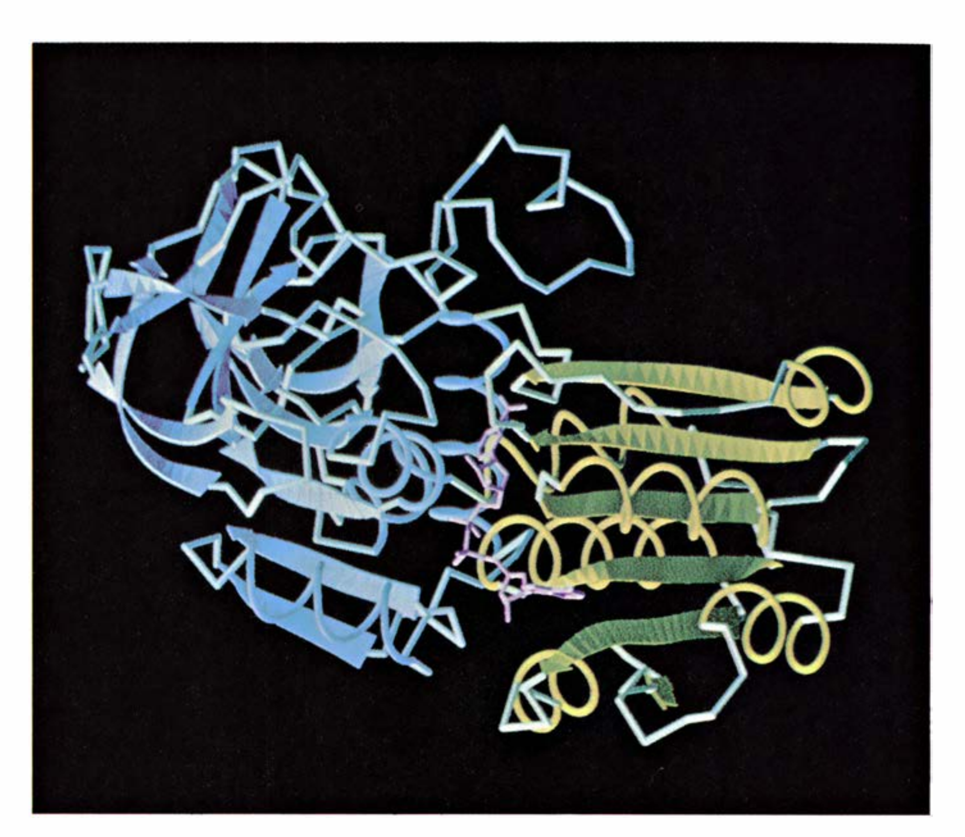
Decimos que la secuencia de aminoácidos de una proteína constituye su estructura primaria. La conformación completa de una cadena polipeptídica en tres dimensiones se denomina su estructura terciaria. Como sugieren ambas expresiones, existe un nivel de organización intermedio: la estructura secundaria. Describe el plegamiento local de la cadena a través de

las unidades estructurales que aparecen en casi todas las proteínas.

Hace unos 35 años, Linus Pauling demostró que el esqueleto de la proteína puede enrollarse formando una hélice apretada, estabilizada por numerosos enlaces de hidrógeno; denominó hélice alfa a esta estructura. La hélice da una vuelta por cada 3,6 aminoácidos, y los enlaces de hidrógeno se forman entre aminoácidos situados cada cuatro posiciones. En los enlaces no intervienen las cadenas laterales, sino que se extienden entre el grupo NH de una unidad peptídica y el grupo CO de otra; por ello, la estabilidad de la hélice no depende estrictamente de la identidad de las cadenas laterales, y muchas secuencias diferentes de aminoácidos asumen espontáneamente la forma de la hélice alfa.

Casi al mismo tiempo, Pauling propuso una segunda configuración estable, que designó como hoja beta, o plegamiento en beta. En este caso se trata de tramos de cadena polipeptídica situados unos al lado de otros, que discurren en el mismo o en sentidos opuestos (paralelos o antiparalelos), uniéndose los tramos adyacentes por medio de enlaces de hidrógeno. También en este caso los enlaces de hidrógeno unen grupos NH y CO del esqueleto de la molécula.

Algunas proteínas están formadas mayoritariamente por hélices alfa y, en otras, predominan las hojas beta. En una proteína globular típica el interior puede ser un haz de fibras beta que van y vuelven diametralmente, quedando la superficie cubierta de hélices alfa. Las hélices exteriores suelen presentar una periodicidad característica en su secuencia de aminoácidos. Las cadenas laterales no polares aparecen en cada tercera o cuarta posición, y se dirigen hacia el interior de la molécula; el resto de las cadenas laterales, expuestas al ambiente acuoso, tienden a ser polares.



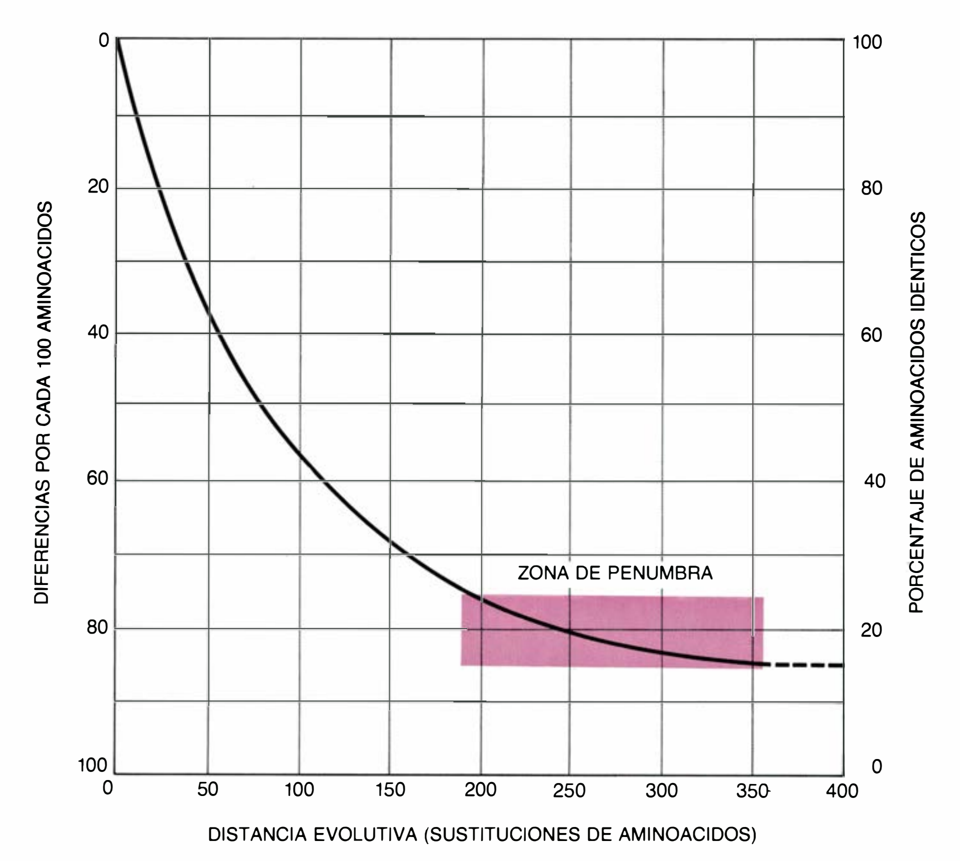
6. ESTRUCTURA SECUNDARIA de la alcohol deshidrogenasa, formada por numerosas hélices alfa y hojas beta, conectadas por breves tramos de estructura "aleatoria". El dominio de unión a la coenzima NAD aparece en verde y amarillo; el dominio catalítico, al que se une la molécula de alcohol, aparece en azul. Se muestra, en púrpura, una molécula de NAD unida cerca de la frontera entre los dominios de la proteína.

Desde hace pocos años se viene hablando de otro nivel más en la estructura proteínica. Por ejemplo, un elemento estructural presente en numerosas proteínas consta de dos fibras beta conectadas por un segmento de hélice alfa. Las tres piezas encajan entre sí cómodamente cuando se disponen en determinados ángulos. Una faceta estructural de esta clase, que típicamente comprende entre 30 y 150 aminoácidos, se llama dominio. Puede considerarse una unidad, pues su conformación está determinada casi exclusivamente por su propia secuencia de aminoácidos. El dominio beta-alfa-beta es de particular importancia: cuando se sitúan uno junto a otro dos dominios de este tipo, la grieta que forman suele actuar de centro de unión.

Una proteína globular típica contiene unos 350 aminoácidos, que podrían plegarse de innumerables maneras. La jerarquía existente en las estructuras de una escala superior de tamaño proporciona cierto orden. Las interacciones locales entre aminoácidos próximos origina hélices alfa, hojas beta u otras formas de estructura secundaria. Esos subconjuntos se organizan en dominios que actúan a modo de unidades más o menos coherentes. La disposición geométrica de los dominios es lo que constituirá la estructura terciaria. La presencia de las mismas estructuras secundarias y dominios en muchas proteínas diferentes indica que no se trata de meras abstracciones artificiales introducidas por el bioquímico, sino que, por el contrario, parecen constituir unidades fundamentales en la evolución y diversificación de las proteínas.

Muchas proteínas poseen un nivel de organización por encima de la estructura terciaria. Están formadas por varias cadenas polipeptídicas, unidas entre sí por una variedad de enlaces débiles y, a veces, estabilizadas por enlaces disulfuro. Algunas proteínas también contienen componentes no peptídicos. Por ejemplo iones metálicos, esenciales para la actividad de ciertas enzimas, o una estructura denominada anillo de porfirina, que se encuentra en la hemoglobina, la clorofila y otras muchas proteínas. También las hay "decoradas" en su superficie con cadenas de moléculas de azúcar. Estas características adicionales de la estructura de las proteínas resultan de la elaboración de la molécula con posterioridad a la síntesis de los polipéptidos.

En cierto modo, resulta notable que cualquier proteína adopte siempre una única conformación, bien definida. El estado plegado posee una energía libre más baja que cualquier otra configuración alternativa, pero la diferencia es pequeña. En una hélice alfa, la formación de enlaces de hidrógeno entre las unidades peptídicas reduce la energía, pero si se desplegase la hélice, los mismos grupos formarían enlaces de hidrógeno con el agua. Además, puesto que la hélice es una estructura ordenada, tiene baja entropía, lo cual tiende a aumentar la energía libre. Merece la pena señalar que no todos los



7. EVOLUCION DE LAS PROTEINAS, reseguida comparando las secuencias de aminoácidos. El número de posiciones de aminoácidos en que difieren dos proteínas constituye una medida de su distancia evolutiva, pero la relación no es la de una simple proporcionalidad. Una sola posición puede sufrir múltiples mutaciones, con lo que el número de sustituciones de aminoácidos suele ser mayor que el número de diferencias observadas. Por añadidura, al contrastar dos secuencias se deben tener en cuenta inserciones y deleciones, además de las sustituciones. En consecuencia, cuando dos proteínas son idénticas en menos del 15 por ciento de sus posiciones, no puede distinguirse si se trata de ascendencia común o coincidencia por azar. Los parentescos evolutivos más interesantes se sitúan en la "zona de penumbra": una identidad de entre el 15 y el 25 %.

polipéptidos tienen una estructura plegada estable. Las secuencias aleatorias de aminoácidos, construidas artificialmente, suelen ser ovillos sueltos y flexibles que continuamente pasan de una estructura a otra. Las proteínas que se presentan en los sistemas vivos parecen constituir un subconjunto de polipéptidos seleccionado por la estabilidad de su estructura.

¿Cómo llega a conocerse la estructura de las proteínas? De todos los métodos que utiliza el químico de proteínas, el que ha resultado más revelador es la cristalografía de rayos X. Con él, se pretende obtener una imagen de difracción, haciendo pasar rayos X a través de una muestra cristalizada de la proteína. Dada la estructura periódica del cristal, la imagen es, esencialmente, la misma que se generaría de observarse una sola molécula. A partir del modelo de difracción se construye un mapa que muestra la densidad electrónica de la proteína y, del mapa, se infiere el camino que sigue el esqueleto y las posiciones que ocupan las cadenas laterales.

La cristalografía de rayos X proporciona una visión tridimensional y muestra la proteína con un grado de detalle atómico. A través de ese tipo de estudios se han resuelto los principales problemas que planteaba la estructura de las proteínas: que el interior está repleto de cadenas laterales no polares; que la hélice alfa y la hoja beta son algo más que estructuras hipotéticas; que la mayoría de las proteínas son glóbulos compactos, con superficies llenas de hoyuelos, y muchos otros más. Los cristalógrafos también han confirmado la existencia de dominios y descubierto pautas comunes entre ellos.

Teóricamente podría estudiarse la estructura tridimensional de todas las proteínas por cristalografía de rayos X, pero en realidad no ocurre así. En primer lugar, la cristalización de una proteína suele exigir una buena proporción de habilidad química; en segundo lugar, el análisis subsiguiente de las figuras de difracción es arduo. Se tardó 23 años en cartografiar la estructura de la hemoglobina. Hasta ahora sólo se han resuelto las estructuras en tres dimensiones de unas 100 proteínas.

En la década de 1950, la mera determinación de la secuencia de aminoácidos de una proteína constituía ya una tarea difícil y laboriosa, incluso para una proteína pequeña. Primero se establecía la composición total de la proteína, rompiendo todos los enlaces peptídicos de una muestra del material y determinando la cantidad de cada aminoácido. Otras muestras sólo se digerían parcialmente, de modo que quedaran fragmentos pequeños, que también se sometían al análisis de su composición en aminoácidos. Un ardid químico revelaba qué aminoácido se encontraba en el extremo amino de cada fragmento. Después de reunir información de muchos fragmentos que se solapaban entre sí, el bioquímico abordaba la resolución del complicado rompecabezas, intentando encajar todas las piezas.

En los años 60, la tecnología del análisis de las secuencias mejoró de forma espectacular y, hacia 1970, ya se había automatizado el procedimiento. Se retiraban los aminoácidos de uno en uno a partir del extremo amino terminal de la cadena y se identificaban. Existía aún un límite en la longitud máxima de cadena que se podía manipular, lo que obligaba aún a descomponer en fragmentos las proteínas de gran tamaño.

En los últimos años, un método indirecto de análisis de la secuencia ha venido casi a suplantar las técnicas tradicionales de la química de proteínas. La clave del nuevo método radica en que es mucho más fácil la determinación de la secuencia de nucleótidos de una molécula de ADN que la secuenciación de los aminoácidos de una proteína. Si se dispone de un tramo de ADN que codifica la estructura de la proteína, resulta sencillo secuenciar el ADN y traducir después cada codón de tres letras al aminoácido correspondiente.

La operación más difícil es encontrar el ADN que codifica la proteína. En una de las estrategias al uso, el primer paso consiste en analizar unos 25 aminoácidos del extremo amino de la proteína. Se "retrotraduce" un segmento apropiado de entre cinco y siete aminoácidos de ese tramo en una secuencia de nucleótidos. El proceso no carece de ambigüedad: aunque cada codón especifica exactamente un aminoácido, la mayoría de los aminoácidos pueden especificarse por más de un codón. La clave consiste en escoger una secuencia que tenga la menor ambigüedad posi-

ble y luego generar una molécula de ADN para cada una de las posibles retrotraducciones. Si entre los aminoácidos hay un residuo de histidina, por ejemplo, se sintetiza ADN tanto con el codón *CAT* como con el codón *CAC*, en la posición apropiada, pues ambos especifican histidina.

El ADN obtenido por retrotraducción sirve de sonda para encontrar las secuencias complementarias de ADN. Se marca con un isótopo radiactivo de fósforo y se le permite hibridar con el ADN de una biblioteca de fragmentos génicos clonados. Los clones que presentan la secuencia complementaria se identifican con facilidad gracias a la presencia del fósforo radiactivo; se aislan, se cultivan en abundancia y luego se secuencian. Aunque el procedimiento pueda parecer poco directo, es más sencillo y exacto que el análisis químico de los fragmentos proteicos. Las secuencias polipeptídicas secuenciadas hasta la fecha suman ya 4000.

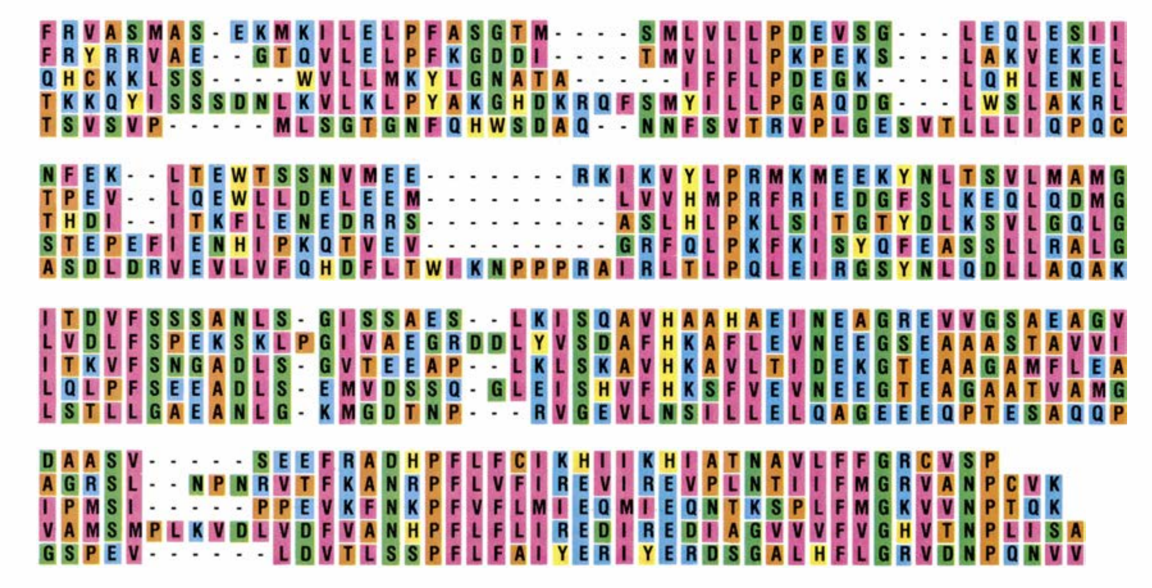
El genetista Theodosius Dobzhansky escribió: "Nada tiene sentido en biología si no es a la luz de la evolución". Lo mismo vale para la estructura proteica: sólo tiene sentido en términos de la evolución de las proteínas. Del mismo modo que todos los organismos vivos descienden de unos pocos progenitores, la gran mayoría de las proteínas deben proceder de un número muy pequeño de arquetipos.

Las pruebas que apoyan esta afirmación provienen de muchas fuentes, y sólo la defenderé muy brevemente. El argumento más directo estriba en la clara dificultad que supone "inventar" una proteína de novo. Como se señaló más arriba, la mayoría de los polipéptidos estocásticos ni siquiera se pliegan y, mucho menos, presentan una función biológica; es más probable que una proteína nueva surja por modificación de otra preexistente. Abundan las pruebas de la existencia de ese proceso en las secuencias específicas que están codificadas por más de un segmento del ADN de un genoma dado. Además, los cristalógrafos han encontrado repetidamente que, en las proteínas que se pliegan para formar dominios localizados aparecen las mismas pautas en ambientes diversos. Cuando se ha probado el éxito de una subestructura, parece que se utiliza repetidamente.

El mecanismo primario de la evolución de las proteínas es la duplicación génica: la célula pasa a tener dos ejemplares (o más) de un mismo gen. Un ejemplar conserva su antigua función, de modo que la viabilidad del organismo no se ve comprometida por falta de una proteína esencial. El ejemplar redundante, por el contrario, tiene libertad para mutar sin las restricciones impuestas por la selección natural. La mayoría de las mutaciones generan proteínas no funcionales, pero en ocasiones un cambio ventajoso puede crear una versión mejorada de la proteína original, o incluso una proteína dotada de una función enteramente nueva.

Deben distinguirse claramente dos aspectos en el estudio de la evolución de las proteínas. Por una parte, cabe examinar la "misma" proteína en varias especies, observando cómo ha cambiado la estructura al paso del tiempo biológico. Por ejemplo, se ha determinado la secuencia de aminoácidos del citocromo *c*, una proteína que transfiere electrones en el metabolismo, en más de 80 especies, desde las bacterias hasta el hombre. Uno de los resultados de esos estudios es la taxonomía de los organismos basada en el parentesco de sus proteínas. Por otra parte, cabe comparar las estructuras de varias proteínas dentro de una misma especie. De este trabajo puede resultar la elaboración del árbol genealógico de las propias proteínas.

La comparación de unas especies con otras facilita considerablemente la comprensión de las características químicas de las proteínas. Entre organismos estrechamente emparentados, el cambio más frecuente suelen ser la sustitución de un aminoácido por otro dotado de propiedades similares, con lo que no se altera la estructura de la molécula en su conjunto. A medida que crece la distancia evolutiva entre las especies, las secuencias van divergiendo. Al final, la consanguinidad de las especies apenas si se detecta, aunque la estructura terciaria de las dos proteínas



8. REVELA LA PALEONTOLOGIA MOLECULAR la existencia de una ascendencia común en cinco proteínas de diversas especies. Cada proteína se ha representado por parte de su secuencia de aminoácidos, indicados de acuerdo con las abreviaturas de una letra dadas en la figura 2; los colores indican aminoácidos con propiedades similares. Los trazos indican brechas o inserciones. Los residuos de cisteína pueden formar reticulaciones que estabilizan la estructura plegada. La ovalbúmina es una proteína abundante en la clara de huevo; la antitrombina III y la alfa 1-antitripsina se encuentran en el plasma sanguíneo; la proteína *Z* de la cebada se descubrió recientemente en las semillas de cebada: el angiotensinógeno es el precursor de una pequeña proteína que regula la presión sanguínea. Se sabe que tanto la antritrombina III como la alfa 1-antitripsina actúan como inhibidores de proteasas (enzimas que rompen las cadenas de proteína). Aunque se ignora la función de las otras proteínas, parece, sin embargo, que también pudieran corresponderles la tarea de inhibición de proteasas.



9. SECUENCIA COMUN incluida en seis proteínas diferentes. Sugiere que pudieran haber compartido información genética en algún momento de su evolución. Sólo se muestra un segmento de cada proteína, que corresponde al único dominio identificable. Las similitudes dentro del dominio son inconfundibles, aunque algunas de las proteínas difieren considerablemente en otras partes de sus estructura. Todo parece indicar que el ADN que codifica el dominio se ha copiado de un gen a otro. Estas proteínas son productos recientes de la evolución, pues se encuentran solamente en los vertebrados. (Dibujo de Edward Bell.)

se asemeja de forma inconfundible. Se deduce de ello que secuencias de aminoácidos completamente diferentes pueden plegarse adoptando la misma estructura tridimensional.

Al comparar las proteínas dentro de una misma especie se advierte pronto que existen amplias familias de moléculas emparentadas. Por ejemplo, la media docena de polipéptidos que constituyen las diversas formas de hemoglobina y el único polipéptido de la mioglobina comparten claras semejanzas. No sólo son análogos (lo que significa que desempeñan una función similar) sino también homólogos (es decir, derivan de un antecesor común). Entre las enzimas no resulta sorprendente que aquellas que catalizan reacciones similares posean a menudo secuencias homólogas. Un ejemplo muy ilustrativo lo proporcionan la glutatión reductasa y lipoamida reductasa. Las dos enzimas catalizan la transferencia de iones de hidrógeno a compuestos que llevan azufre: las dos son idénticas en más del 40 por ciento de las posiciones de sus secuencias de aminoácidos. Grado de homología semejante se aprecia entre quimotripsinógeno y tripsinógeno, y entre la ornitina transcarbamilasa y la aspartato transcarbamilasa.

A medida que el parentesco entre proteínas se distancia, resulta más difícil detectar la homología entre secuencias. Lo que es peor, la aritmética de la comparación de las secuencias es tal, que secuencias sin parentesco alguno pueden aparecer tentadoramente semejantes. De entrada, cabe esperar que dos polipéptidos escogidos al azar tengan idénticos aminoácidos en el 5 por ciento de las posiciones de sus secuencias, puesto que son 20 los aminoácidos posibles. Si pudiera establecerse la comparación escribiendo las secuencias una encima de la otra y marcando las coincidencias, sería aplicable ese límite del cinco por ciento. En realidad debe emplearse un método más elaborado.

No sólo se alteran las proteínas por la sustitución de un aminoácido por otro, sino también por inserción o deleción de aminoácidos. Sean dos proteínas, idénticas en todo salvo en que una ha perdido su primer aminoácido: si no se tiene en cuenta esta deleción, las dos proteínas parecerían desprovistas de cualquier parentesco. Por otro lado, si se admite sin límite alguno la existencia de brechas e inserciones, podría forzarse a que cualquier pareja de proteínas coincidieran en cualquier grado escogido arbitrariamente. En la práctica, la comparación de las secuencias se hace con un programa de ordenador que premia las coincidencias entre aminoácidos idénticos o similares y castiga las brechas e inserciones. Aún así, resulta virtualmente imposible distinguir entre similitud por azar y ascendencia común cuando el número de posiciones idénticas se sitúa por debajo del 15 por ciento, aproximadamente.

Al tratar de establecer la genealogía de las proteínas, el parentesco de mayor interés es el que se da entre secuencias que (después de los ajustes de brechas e inserciones) resultan idénticas entre el 15 y el 25 por ciento. En esa "zona de penumbra" es donde deben buscarse las raíces del árbol genealógico para encontrar moléculas que divergieron en los primeros estadios de su evolución.

A comienzos de los años 60 se llegó a la conclusión de que un archivo de secuencias de aminoácidos facilitaría los estudios de la evolución de las proteínas y, en 1965, Richard Eck y Margaret O. Dayhoff publicaron el primer volumen del *Atlas de secuencias y estructuras proteicas*. Su propósito era publicar anualmente "todas las secuencias que pudieran caber entre un par de cubiertas". Pronto se advirtió, sin embargo, que las cubiertas tendrían que estar muy lejos una de otra y que las cintas de ordenador resultarían un medio de trabajo más adecuado para la comparación de secuencias. Hoy, cualquier investigador tiene acceso a amplios bancos de secuencias desde una terminal de ordenador. Hace unos 10 años, trabajando con una cinta del *Atlas*, comencé a estudiar la filogenia de ciertas proteínas. Pronto me encontré elaborando mi propio banco de datos, y en cuanto se reseñaba una nueva secuencia, la incluía en el archivo para ver determinar su parecido con alguna ya conocida. El número de coincidencias resultó sorprendentemente grande.

Quisiera dar un ejemplo de cómo funciona esta paleontología molecular. A finales de la década de 1970, Staffan Magnusson y sus colaboradores, de la Universidad de Aarhus, Dinamarca, determinaron la secuencia de aminoácidos de la antitrombina III, una proteína del plasma sanguíneo de los vertebrados. La antitrombina III neutraliza la trombina, un factor de coagulación de la sangre cuyo modo de acción es el de las proteasas, enzimas que cortan proteínas. Casi al mismo tiempo, un segundo grupo reseñó la secuencia de la alfa 1-antitripsina, otro inhibidor de la proteasa del plasma sanguíneo. El grupo danés comparó las dos secuencias y descubrió que eran idénticas en 120 de 390 posiciones, una homología de aproximadamente el 30 por ciento. Parecía obvio que ambas descendían de una proteína ancestral común.

No mucho después, científicos de la Fundación Nacional de Investigación Biomédica en la Universidad de Georgetown introdujeron en su ordenador la secuencia de la ovalbúmina, proteína abundante en la clara de huevo. Descubrieron que se parecía a la antitrombina III y a la alfa 1-antitripsina, también en una proporción del 30 por ciento, aproximadamente. El descubrimiento constituyó una sorpresa, pues hasta entonces nadie tenía la menor idea de cuál pudiese ser la función de la ovalbúmina. Había que considerar ahora la posibilidad de que fuese un inhibidor de proteasas.

En 1983, un grupo japonés publicó la secuencia del angiotensinógeno, precursor de una pequeña hormona peptídica que regula la presión sanguínea. Aunque la propia hormona tiene sólo 10 aminoácidos, el precursor contiene hasta unos 400 residuos. Cuando comparé la secuencia del angiotensinógeno con las de mi banco de datos, la bús-

queda reveló una semejanza débil con la alfa 1-antitripsina. La semejanza era del tipo de las que se dan en la zona de penumbra, sólo un 20 por ciento de identidad, pero un análisis estadístico me convenció de que las dos proteínas eran miembros de la misma familia. Desde entonces, otros autores han realizado observaciones que lo corroboran, y no cabe ya duda del parentesco.

Otro grupo danés ha añadido recientemente una quinta rama a ese árbol inesperado de proteínas emparentadas: se trata de una sustancia de función desconocida que se halla en semillas de cebada, la llamada proteína *Z*. Aunque el tamaño de la proteína *Z* es sólo la mitad del de las otras (alrededor de 200 aminoácidos) está claramente emparentada con ellas. Incluso el tamaño mitad encaja bien con ciertos hallazgos experimentales que indican que las otras proteínas de la familia presentan dos dominios principales.

Del descubrimiento de esas cinco proteínas emparentadas en ambientes diferentes se infieren dos corolarios. Primero, tanto si las 4000 secuencias de aminoácidos conocidas hoy representan una fracción significativa de todas las proteínas, como si no, se ha llegado a un punto donde cualquier nueva secuencia tiene grandes probabilidades de parecerse a otra ya registrada. Segundo, ciertas disposiciones de aminoácidos en gran escala son tan útiles en bioquímica que se han empleado una y otra vez en diferentes contextos. Con frecuencia esas unidades funcionales se pueden identificar con los dominios revelados por los estudios de estructura.

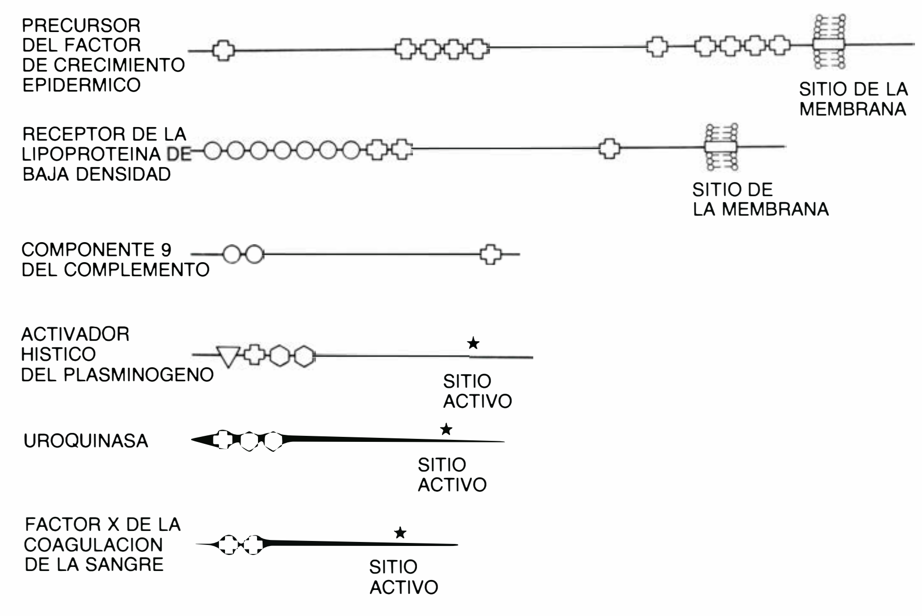
Uno de los dominios que gozan de mayor distribución lo descubrieron, en 1974, Michael G. Rossmann y sus colegas, de la Universidad de Purdue. Partiendo de mapas de difracción de rayos X, advirtieron que varias enzimas compartían una peculiaridad importante: aunque la estructura de conjunto de las proteínas era completamente diferente, todas contenían un dominio de unos 70 aminoácidos que presentaba esencialmente la misma pauta de plegado. Las enzimas también diferían mucho en su función, pero tenían en común la capacidad de unión con ciertas coenzimas, concretamente, el dinucleótido de nicotinamida y adenina (NAD), el mononucleótido de flabina (FMN) y el monofosfato de adenosina (AMP). Las tres moléculas presentan en su estructura un mononucleótido. El dominio ubicuo en las enzimas constituía el centro de unión a los mononucleótidos, y Rossmann le dio el nombre de plegamiento de mononucleótido.

El descubrimiento llevó a Rossmann a proponer una hipótesis atrevida. Imaginó que el dominio que se hallaba en todas esas enzimas era el fantasma de una proteína primitiva de tiempos precelulares. Su capacidad de unión con mononucleótidos resultaba tan importante que se incorporó a la maquinaria de varias de las enzimas prototípicas que aparecieron en los primeros sistemas vivos. Se la puede reconocer aún hoy día.

El modelo resulta atractivo. Parece probable que las primeras proteínas activas fueran pequeñas y que su principal capacidad fuese la de unión con otras moléculas. La reunión de dos proteínas pequeñas capaces de unirse a dos moléculas pequeñas diferentes supondría el inicio de los rudimentos de la catálisis. Llegados aquí, una sucesión de duplicaciones génicas pudo generar una extensa familia de proteínas estables. En las primeras etapas puede que las proteínas débilmente reunidas fuesen torpes e ineficaces. Pero las oportunidades de mejora debieron ser numerosas, y la selección natural de las estructuras mutantes debió dominar los acontecimientos. En última instancia, las proteínas resultarían tan apropiadas para su función, y las enzimas tan eficaces, que prevalecería “el rechazo natural” de variantes mutantes.

No mucho después de que Rossmann sugiriera que las proteínas primitivas pudieran haberse creado por fusión de dominios útiles, los estudios de ADN recombinante condujeron al descubrimiento deslumbrador de que los genes eucariotas no son continuos. Constan de segmentos que codifican parte de la estructura de una proteína (exones) separados por largos tramos de ADN que no codifican (intrones). En algunos casos se observó que los intrones se situaban justamente en, o cerca de, los límites entre dominios de la proteína.

Esta correspondencia llevó a Walter Gilbert, de la Universidad de Harvard, a proponer que los exones eran los equivalentes genómicos de las porciones proteínicas intercambiables de la hipótesis de Rossmann. En opinión de Gilbert, no sólo se crearon las primeras proteínas por ensamblaje de dominios estables, sino que, además, la evolución ha mantenido el aislamiento genético de los dominios durante el transcurso de varios miles de millones de años. Se advierte fácilmente que esta organización genómica debió proporcionar ventaja adaptativa: el continuo reensamblaje de dominios en nuevas combinaciones generaría nuevas proteínas, en ocasiones útiles. Las ideas de



10. MEZCLA DE DIVERSOS DOMINIOS: constituye una prueba de la difusión continua de información genética en los organismos superiores. Se representan cinco dominios, mediante diversos símbolos geométricos, y se indica su distribución en seis proteínas. El dominio cuya secuencia aparece en la figura 9 es el que aquí se señala con una cruz. No resulta fácil explicar la distribución de los dominios suponiendo que todos los de una misma proteína se hayan heredado del mismo gen ancestral; por el contrario, parece mejor que se hayan propagado de una proteína a otra mediante redistribuciones cromosómicas. En varios casos, las fronteras entre dominios de la proteína se corresponden con los límites entre exones e intrones en el genoma, lo cual puede que haya facilitado la mezcla de los distintos segmentos génicos en el curso de la evolución.

Gilbert han tenido una amplia aceptación, aunque también existen argumentos en contra. En muchas proteínas eucariotas los intrones se hallan en otros lugares, no en los límites obvios entre dominios. Además, los genes procariotas carecen totalmente de intrones: es preciso suponer que se eliminaron en interés de la economía genómica.

Ultimamente ha salido a la luz otro ejemplo notable de dispersión de dominios por un grupo de proteínas. En este caso, las proteínas son todas producto reciente de la evolución: sólo se encuentran en vertebrados que surgieron en los últimos mil millones de años. Es más, la distribución de los dominios en estas proteínas no se explica fácilmente como simple resultado de la descendencia a partir de un antecesor común. Un dominio se encuentra en 18 ejemplares dispersos entre seis proteínas. Parece claro que estas subunidades han pasado libremente de una proteína a otra y se han insertado donde se precisaba su actividad funcional. Se ha probado para varias de las proteínas que el ADN que codifica los dominios está delimitado precisamente por intrones. En estos casos no hay posible duda acerca de que la organización del genoma en exones e intrones es la que ha permitido la redisposición de los productos génicos en mosaico.

¿Confirma ello la hipótesis de Gilbert de que el proceso de mezcla de exones de dominios ha constituido un aspecto decisivo de la evolución de las proteínas desde los primeros tiempos? Aunque esa mezcla sigue dándose hoy, sin duda alguna, creo que es un error suponer que el mismo mecanismo operaba ya en los organismos primitivos. Podemos contar con los intrones de los genes eucariotas gracias a que una compleja maquinaria de corte y empalme asegura que los tramos de ARN mensajero se traducen correctamente a proteína. Parece poco probable que el mismo aparato operase también en las primeras formas de vida. Quizás el intercambio de exones en las proteínas mosaico de los vertebrados constituya una representación de antiguos acontecimientos, aunque con un montaje totalmente moderno.

Tales variaciones sobre el mismo tema son de esperar en un sistema tan complejo como la célula viva, donde el cambio de una molécula puede afectar a otras miles, incluida la propia maquinaria responsable de la síntesis de la primera molécula. De la misma manera que evolucionan las proteínas, también lo hacen sus mecanismos de evolución.

Moléculas de la membrana celular

Forman espontáneamente un líquido bidimensional que controla cuanto entra y sale de la célula. Algunas células reciclan una zona de membrana equivalente a su superficie en menos de una hora

Mark S. Bretscher

La organización de la actividad química en todas las células superiores depende en gran parte de la compartimentación proporcionada por las membranas biológicas. Los sillares de las membranas son una clase de moléculas llamadas lípidos, que gracias a las interacciones que establecen entre sí en un medio acuoso forman un compartimento cerrado y flexible. Empotradas en la matriz lipídica encontramos muchos tipos diferentes de moléculas proteicas, que confieren, a cada tipo de membrana, su identidad distintiva y llevan a cabo sus funciones especializadas. La misión primaria de toda membrana es, por tanto, separar lo que ella encierra del entorno limitante con la misma. Dentro de la célula, por ejemplo, las membranas aíslan las reacciones químicas que se desarrollan en el seno de cada orgánulo intracelular. La propia célula queda encapsulada por su propia membrana celular: la membrana plasmática. De todas, la plasmática es la membrana que se conoce mejor. A ella dedicaremos el grueso de nuestra exposición.

Si en la célula han de penetrar nutrientes o si la han de abandonar los materiales de desecho, es obvio que unos y otros habrán de cruzar la barrera creada por la matriz lipídica de la membrana plasmática. El paso se suele realizar contando con la mediación de moléculas proteicas globulares que salvan la membrana plasmática y catalizan la transferencia de nutrientes específicos y moléculas de desecho. Sin embargo, algunos de los nutrientes requeridos por las células eucarióticas son demasiado grandes para transportarlos así a través de la membrana. En ese caso, ciertas moléculas proteicas receptoras, ancladas por su cola en la membrana plasmática, se unen a los nutrientes del entorno ambiental. Mediante un proceso llamado endocitosis, se desarrollan unas cavidades ("caveolas") en la membrana que engullen a muchas de estas moléculas receptoras y los nutrientes unidos a ellas. A los nutrientes en este estado se les llama ligandos. Las caveolas se cierran, desprendiéndose de la membrana y emigrando hacia el interior celular, formando así vesículas en el citoplasma (fluido interno de la célula). Al mismo tiempo, vesículas que provienen del interior de la célula se fusionan con la membrana plasmática y expulsan sus contenidos al entorno ambiental. Tales invaginaciones y fusiones hacen circular repetidamente la membrana desde la superficie de la célula hasta su interior, y a la inversa. Cada 50 minutos, una extensión de la membrana equivalente a la totalidad de la superficie celular toma parte en el ciclo.

El estudio de la membrana plasmática se ha centrado en los últimos años en los mecanismos subyacentes a esta circulación, así como en sus diversos efectos. Aunque durante algún tiempo habíase aceptado que la función primaria del ciclo endocítico consistía en introducir nutrientes específicos en la célula, cada vez se advierte con mayor claridad que puede servir también para otros fines. Así, apoyándome en mis últimos trabajos (que no voy a describir aquí), puedo afirmar que la célula aprovecha el ciclo endocítico para moverse sobre un substrato.

Otro asunto central: comprender cómo cada tipo de membrana, plasmática incluida, adquiere su propia dotación exclusiva de proteínas, que determinará su identidad y sus funciones. El problema relativo a la identidad de la membrana se complica ante el continuo intercambio de membrana entre los orgánulos celulares que ocurre, por ejemplo, durante el ciclo de endocitosis. Supuesto, pues, este ajetreo entre membranas, ¿cómo se mantiene en cada una la integridad de su dotación proteica?

La estructura fundamental de toda membrana es la doble capa de moléculas lipídicas, arquitectura que fue propuesta ya en 1925 por E. Gorter y F. Grendel, de la Universidad de Leiden. En la naturaleza han surgido diversas moléculas lipídicas, que comparten todas una propiedad crítica: un extremo de la molécula, soluble en agua, se distingue, químicamente, por su carácter hidrofílico; el otro extremo, un hidrocarburo, oleoso e insoluble en agua por tanto, se caracteriza químicamente por su naturaleza hidrofóbica.

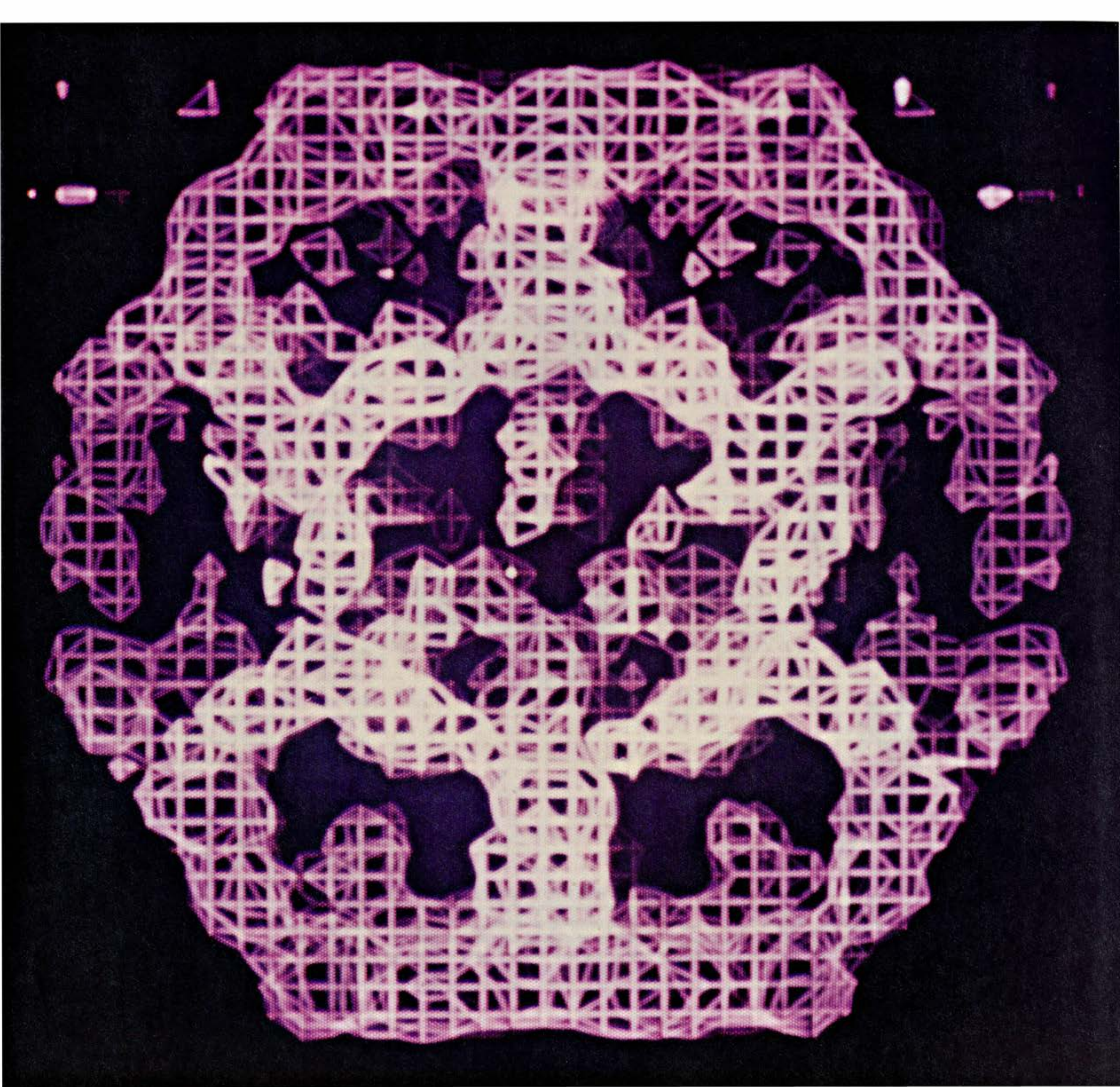
Los lípidos de membrana más comunes pertenecen a la clase de los fosfolípidos. Tienen un grupo de cabeza

1. RETICULADO EN FORMA DE CESTILLO de moléculas de clatrina. Estas moléculas proteicas cubren una porción cerrada y esférica de membrana, llamado vesícula, que se aisló de una placenta humana. La vesícula cubierta deriva de la membrana plasmática de la célula a través de un proceso dinámico llamado endocitosis mediada por receptor, gracias al cual las macromoléculas entran en la célula. Cuando las moléculas seleccionadas en el exterior de la célula quedan adheridas a receptores proteicos de la membrana, una cubierta de clatrina comienza a ensamblarse en el lado de la membrana que da al interior de la célula. Cada molécula de clatrina es una cadena formada por unos 1600 aminoácidos; la cubierta constituye una suerte de panal, que se forma cuando las moléculas se alinean siguiendo un trazado regular. Al crecer la cubierta, la región de membrana a la que está adherida se adentra en el interior celular, en un movimiento que recuerda la formación de una gota de agua en el reborde de un grifo. La protuberancia se separa de la superficie de la célula y se convierte en una vesícula cuya superficie interna lleva los receptores y sus ligandos y cuya superficie externa retiene la cubierta en panal de clatrina, como muestra la imagen. Esta se generó por un computador a partir de una serie de micrografías electrónicas tomadas con varios ángulos de inclinación por Guy Vigers, quien se halla adscrito al Laboratorio de Biología Molecular del Consejo de Investigaciones Médicas de Cambridge. La ampliación es de más de dos millones de veces su diámetro real.

hidrofílico constituido por un fosfato enlazado a un residuo, o resto, que puede ser colina, etanolamina, serina o inositol. El grupo de cabeza se une a dos colas hidrofóbicas, cada una de las cuales es una cadena de ácido graso. El fosfolípido más abundante, ampliamente estudiado, es el que posee un residuo de colina. Se llama fosfatidilcolina. Al igual que otros fosfolípidos, goza de una propiedad destacable: cuando se introduce en un medio acuoso, las distintas moléculas se organizan por sí solas y de forma espontánea en una bicapa. Aquí, las moléculas se autoalinean en una y otra capa, de suerte tal que su eje mayor viene a caer perpendicular al plano de la bicapa. Los grupos hidrofílicos de cabeza están en contacto con agua a ambos lados de la bicapa; las colas hidrofóbicas, oleosas, se encierran en el interior de la bicapa, evitando así el contacto con el agua. Dicha disposición constituye el estado de mínima energía libre para estas moléculas en agua.

En 1965, Alec D. Bangham y sus colegas, del Instituto de Fisiología Animal del Consejo de Investigación Agrícola de Cambridge, demostraron que las bicapas lipídicas forman en el agua vesículas esféricas y cerradas, dotadas de dos compartimentos separados: el fluido interno de la vesícula y el fluido externo a la misma. ¿Por qué se forman esas vesículas? Por la sencilla razón de que si una superficie libre de la bicapa estuviese descubierta, regiones hidrofóbicas de las moléculas fosfolipídicas estarían en contacto con el agua; esto sería energéticamente desfavorable. Es esta propiedad de los lípidos lo que les confiere tanta eficacia en sistemas biológicos: forman espontáneamente una envoltura cerrada de considerable fuerza mecánica.

En la formación de la membrana destacan sobre todo dos rasgos de la bicapa lipídica. En primer lugar, al tener un interior hidrocarburado, son impermeables a la mayoría de las moléculas biológicas: aminoácidos, azúcares, proteínas y ácidos nucleicos e iones. Todas son altamente solubles en agua e inso-



lubles en disolventes hidrocarburados. Esta propiedad capacita a la bicapa para actuar como una barrera.

En segundo lugar, la bicapa formada por fosfolípidos naturales es líquida. Los movimientos estocásticos propios de la fase líquida se manifiestan en la bicapa de dos maneras. Las colas hidrocarburadas de las moléculas fosfolipídicas se agitan con vitalidad, convirtiendo a la bicapa en algo blando y flexible, con una viscosidad más parecida a la del aceite de oliva que a la de la cera parafínica. Además, las moléculas avanzan libremente en dirección lateral dentro de sus propias monocapas; por tanto, dos fosfolípidos vecinos de la misma monocapa pueden intercambiar sus plazas entre sí cada microsegundo, más o menos. No así las moléculas fosfolipídicas de monocapas opuestas, que casi nunca intercambian sus plazas: tal intercambio se hace solamente una vez por año, por término medio. Cada monocapa constituye, pues, un líquido bidimensional. La naturaleza líquida de las bicapas tiene una gran importancia fisiológica. A modo de ejemplo: si la bicapa fuese una estructura rígida, las células nerviosas del cuello se fracturarían cuando una persona hiciese señas con la cabeza.

2. MOLECULA FOSFOLIPIDICA: elemento estructural básico de todas las membranas celulares. En las membranas de las células animales encontramos cuatro tipos principales de fosfolípidos. El mostrado en el diagrama de la izquierda corresponde a la fosfatidilcolina, pero los otros tres difieren del anterior y entre sí solamente en la estructura química de sus grupos de cabeza, que aparecen esquematizados aquí en esferas coloreadas. La carga eléctrica de cada grupo de cabeza hace hidrofílico al grupo. Este grupo de cabeza se conecta con el grupo glicerol, al que se unen a su vez dos cadenas hidrocarburadas (*color gris, a la izquierda*). Las cadenas hidrocarburadas son oleosas y, por consiguiente, hidrofóbicas. (Ilustración de Dana Burns.)

Podría suponerse que en una membrana natural los varios tipos de moléculas fosfolipídicas se distribuyeran al azar en ambos lados de la bicapa. Pero en 1972 descubrí una distribución mucho más ordenada. En la monocapa externa de la membrana plasmática de los glóbulos rojos encontré solamente fosfatidilcolina y su familiar cercano, esfingomielina; ambos contienen colina. Por contra, la monocapa que da al citoplasma tiene fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina. Se cree que el fosfatidilinositol reside también en el lado citoplasmático de la bicapa.

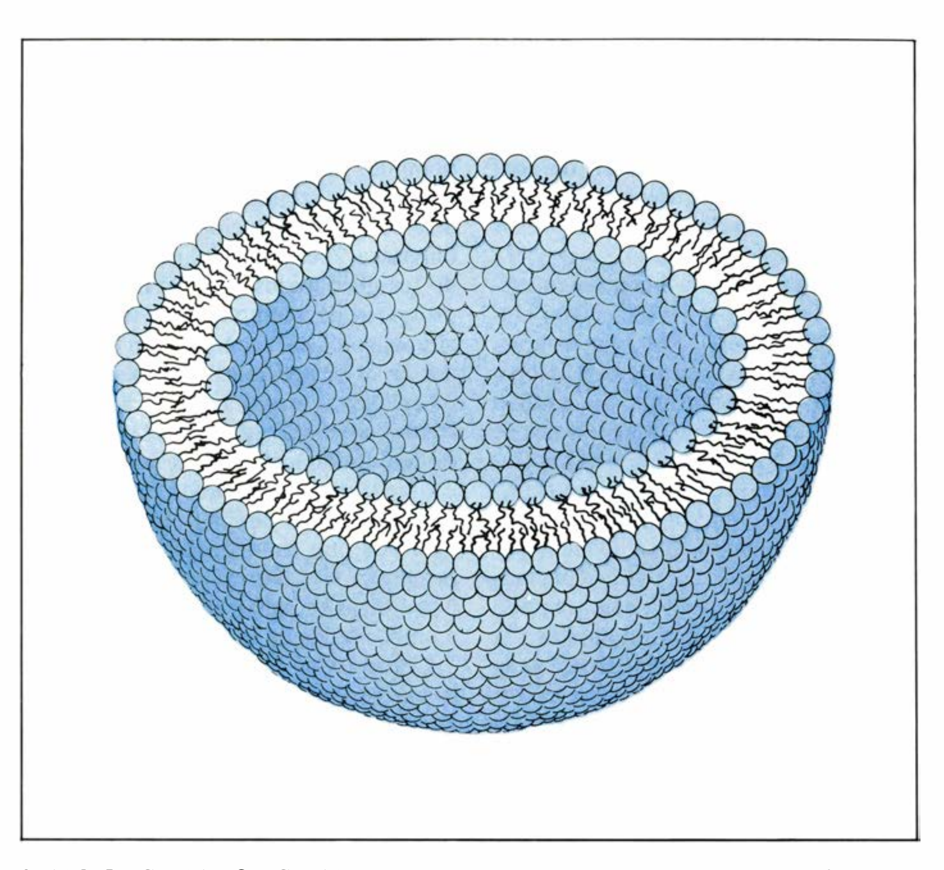
En las membranas de las células animales, además de fosfolípidos, hay otros dos tipos de lípidos: glicolípidos y colesterol. La molécula glicolipídica posee una cola hidrofóbica similar a la de esfingomielina. Como indica su prefijo (glico- viene de una palabra griega que significa dulce), el extremo hidrofílico del glicolípido consta de varios azúcares simples unidos, que forman una estructura lineal o ramificada denominada oligosacárido. Los glicolípidos constituyen solamente una pequeña fracción de los lípidos de la membrana; están confinados en la monocapa externa.

El colesterol, por otro lado, es uno de los principales lípidos de la membrana, junto con los fosfolípidos. Se trata de una molécula grande, discoidal, con cuatro anillos de carbono unidos entre sí, lo que le confiere una estructura rígida. Un extremo del colesterol es hidrofílico, pero el resto es hidrofóbico y se sumerge en la parte hidrofóbica de la membrana plasmática. En la membrana plasmática de las células eucarióticas se cuenta el mismo número aproximado de moléculas de fosfolípidos que de colesterol. La adición de colesterol a la matriz fosfolipídica hace a la membrana algo menos flexible e incluso menos permeable.

Quedan todavía varias incógnitas por despejar relativas a los lípidos de la membrana plasmática. El papel biológico de los glicolípidos, por ejemplo, no se conoce aún. Ni tampoco existe una explicación convincente de la distribución de los fosfolípidos en las bicapas. ¿Por qué las bicapas de las células eucarióticas constan de múltiples fosfolípidos y no sólo fosfatidilcolina? ¿Cuál es la función de la distribución asimétrica de los fosfolípidos? Está, por último, el problema que plantea la misma geometría de la bicapa. Aunque las dos monocapas sean esencialmente independientes entre sí, cubren, por supuesto, una misma superficie. ¿Cuáles son, entonces, las fuerzas laterales

en cada monocapa? ¿Se encuentra una monocapa bajo compresión y la otra bajo tensión? ¿Es acaso igual en ambas la presión lateral?

Así como los lípidos se encargan de formar la matriz, corresponde a las proteínas llevar a cabo todas las funciones específicas de la membrana. En razón de su morfología dentro del núcleo hidrocarburado de la membrana, las proteínas de ésta se agrupan, a grandes ragos, en dos clases o tipos generales. Las proteínas de membrana se pueden clasificar en dos tipos generales en razón de su morfología. El primero pertenece a una figura espiral, estrechamente cerrada, como un bastoncillo: se llama hélice alfa. En esta estructura, los aminoácidos que integran la cadena polipeptídica se disponen de suerte tal que el esqueleto proteico dibuje una hélice; las cadenas laterales de aminoácidos se proyectan hacia el exterior de la hélice. Las proteínas de membrana del segundo tipo presentan una estructura esencialmente globular dentro de la región hidrofóbica de la membrana.



3. ARQUITECTURA MOLECULAR de la membrana de la célula animal. Viene determinada fundamentalmente por las interacciones entre las moléculas fosfolipídicas en un medio acuoso. Los fosfolípidos pueden minimizar su energía en dicho medio formando una bicapa de unos 40 angstrom de grosor. Las colas hidrofóbicas de las moléculas se encierran en el interior de la bicapa, mientras que las cadenas hidrofílicas dan al agua (*azul*) a ambos lados de la bicapa. Si se abriese cualquiera de los bordes de la bicapa, las colas hidrofóbicas quedarían en contacto con agua; por cuya razón, la bicapa se cierra para formar una vesícula, separando de forma eficaz el fluido existente en el interior de la vesícula del fluido que rodea a la misma.

Uno de los ejemplos más claros de proteína de membrana con estructura de hélice alfa es la glicoforina, principal glicoproteína del glóbulo rojo. Aunque su función continúa envuelta en el misterio, conocemos bastante bien su estructura. La mayor parte de la molécula se encuentra fuera de la célula. Región extracelular que consiste en una larga secuencia de aminoácidos a los que se unen cadenas hidrofílicas de oligosacáridos.

En 1971 demostré que la glicoforina atravesaba la membrana celular. Dos años más tarde, Vincent T. Marchesi, a la sazón en el Instituto Nacional Norteamericano de la Artritis, Metabolismo y Enfermedades Digestivas, sugirió la geometría de su porción intermembranar. El y sus colegas determinaron la secuencia aminoacídica de la proteína y descubrieron que su región extracelular estaba unida a un segmento de 26 aminoácidos hidrofóbicos. Los 26 aminoácidos se unen, a su vez, a una corta cola hidrofílica. La secuencia hidrofóbica alcanza la longitud necesaria para atravesar, en hélice alfa, la bicapa; mientras que la cola hidrofílica, corta, permanece en el citoplasma para anclar la proteína en la bicapa.

Sabemos ahora que hay muchos otros tipos de proteínas de membrana fijadas a la superficie celular por una sola hélice alfa hidrofóbica y ancladas en el citoplasma por una cola hidrofílica. Se comportan como receptores de moléculas extracelulares o como marcadores altamente específicos (así, los principales antígenos *H2* en ratones y HLA en humanos), que capacitan al sistema inmunitario para distinguir entre células pertenecientes al organismo e invasores extraños. En esta clase de proteínas se encuadran también receptores inmunoglobulínicos de superficie, de los linfocitos *B*, y las proteínas espiculares de muchos virus con membrana. Puesto que el funcionamiento de estas proteínas depende sobre todo de su dominio extracelular, la estructura intermembranar no tiene por qué ser tan extensa.

No debiera quizá sorprendernos que la estructura globular del segundo tipo de proteínas de membrana esté asociada a funciones que requieren estructuras de cierta magnitud dentro del plano de la bicapa lipídica. Una de las más abundantes en la membrana de los eritrocitos, por ejemplo, es una proteína globular de transporte llamada canal aniónico. Como indica su nombre, la proteína cataliza el intercambio pasivo de iones cargados negativamente, tales como cloruro o bicarbonato, entre el plasma sanguíneo y el citoplasma celular. ¿Cómo actúa una proteína así? De acuerdo con una explicación de primera hora, la proteína enlazaría a un lado de la membrana el ion o molécula a transportar, y lo difundiría a través de la membrana para liberarlo al otro lado. Se propuso también otro esquema: la molécula proteica rotaría dentro de la membrana, acarreando, pues, el lugar de enlace y su substrato enlazado, de un lado al otro de la membrana.

Ninguna de estas explicaciones resultó ser la correcta. En 1971 demostré que lo que ahora se conoce como canal aniónico atraviesa la bicapa molecular y tiene una orientación única y fija en ella. Se defiende hoy la existencia de un pequeño pasadizo para aniones a través de la proteína, lo que les permite cruzar la bicapa.

Una de las proteínas globulares de membrana mejor conocidas es la bacteriorrodopsina, que se extiende de un lado a otro de la membrana de la bacteria *Halobacterium halobium*. La halobacteria, o bacteria halofílica, vive en los lechos salinos de la bahía de San Francisco. La bacteriorrodopsina de la membrana bacteriana es una bomba de protones: captura fotones de la luz solar y se sirve de su energía para bombear protones a través de la membrana

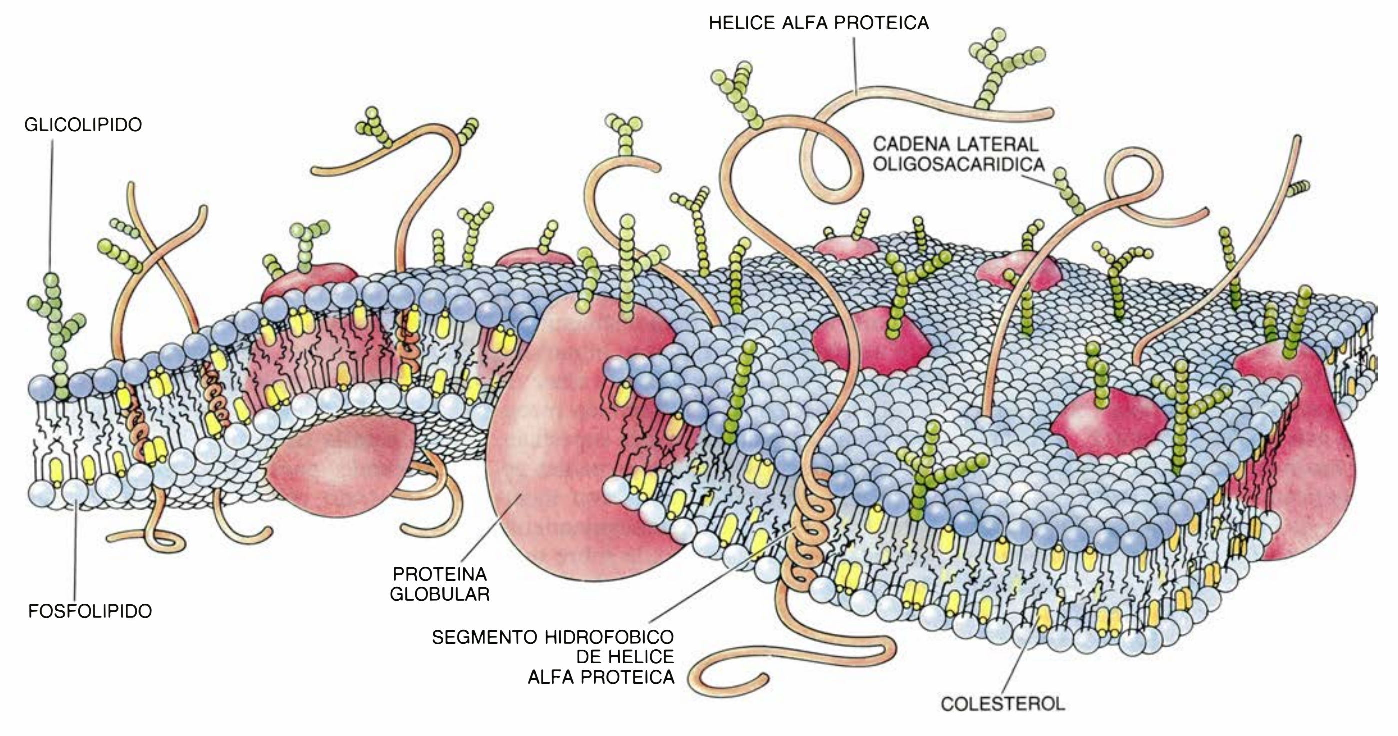
contra un gradiente energético. El gradiente de protones generado por el bombeo lleva consigo una energía potencial, que más tarde sirve para impulsar la síntesis de trifosfato de adenosina (ATP). La ruptura del ATP proporciona energía para los procesos biosintéticos de la bacteria.

La estructura de la bacteriorrodopsina la determinaron en 1975 Nigel Unwin y Richard Henderson, que estaban entonces en el Laboratorio de Biología Molecular de Cambridge. Su modelo muestra que la cadena polipeptídica se dobla sobre sí misma siete veces a través de la bicapa. Cada segmento transmembranar es una hélice alfa, hélices que se empaquetan apretadamente y crean una estructura globular. Una molécula llamada retinal (emparentada con la vitamina A), que está unida a la proteína por un enlace covalente, es la que captura al fotón. No se conoce todavía el mecanismo por el que la energía del fotón se encauza hacia el transporte de protones.

Las proteínas de membrana de las células eucarióticas siguen una regla general: todas llevan una cadena oligosacarídica (si no varias) en sus dominios extracelulares, como hace la glicoforina. Seguimos sin saber con certeza cuál sea la función de las cadenas oligosacarídicas, al igual que en el caso de los glicolípidos. Además, todas las proteínas de membrana, globulares y alfahelicoidales, se mantienen en su lugar en la bicapa gracias al mismo tipo de fuerzas que retienen allí a las moléculas lipídicas: las cadenas laterales de los aminoácidos de la proteína en contacto con las cadenas lipídicas hidrofóbicas son también hidrofóbicas, mientras que las otras partes de tales proteínas son hidrofílicas. Las partes hidrofílicas se hallan expuestas al agua a ambos lados de la bicapa.

Como todas las proteínas de membrana residen en una bicapa líquida, pueden difundirse lateralmente, igual que las moléculas lipídicas. El grado de fluidez de la matriz fosfolipídica determinará la rapidez con la que puedan difundirse. En 1974 Mu-ming Poo y Richard A. Cone, en la Universidad de Harvard entonces, demostraron que la rodopsina movíase unos 10 micrometros por minuto. Parace probable que la mayoría de las demás proteínas de membrana que lo hagan a una velocidad similar. Por tanto, a no ser que existan impedimentos para ello, las proteínas de membrana de la mayoría de las células eucarióticas se difundirán de un extremo a otro de la célula en pocos minutos, por término medio.

El mejor ejemplo de las limitaciones a la difusión de moléculas a través de la membrana es probablemente el de las células unidas entre sí formando capas epiteliales. Se mentan entre ellas las células que tapizan el tubo digestivo, las células en división de la piel y las células de algunos órganos internos como el hígado, el riñón y el páncreas. Las capas epiteliales tienen una sola célula de grosor; a menudo se repliegan





4. MEMBRANA PLASMATICA. Trátase de una bicapa fosfolipídica donde se hallan inmersos el colesterol y diversos tipos de moléculas proteicas. En este diagrama esquemático de la membrana, las moléculas fosfolipídicas de la capa superior, que da al medio externo, se ilustran mediante esferas azules oscuras, cada una de las cuales tiene dos colas que se agitan vivazmente. Se indica en el diagrama de la izquierda el caótico movimiento browniano de las moléculas dentro de las monocapas; la fluidez del interior hidrocarburado viene sugerida por las configuraciones al azar de las colas. La capa del fondo, que da al interior citoplásmico de la célula, presenta una composición fosfolipídica diferente y se ha dibujado en azul claro. Aunque se desarrolla también un intercambio de moléculas fosfolipídicas de un lado a otro de la membrana, ese acontecimiento es extremadamente raro. Dos tipos principales de proteínas de la membrana atraviesan la bicapa. Uno de ellos la cruza convertido en una simple cadena de aminoácidos enrollada en la llamada hélice alfa (*naranja*); la porción intramembranar del segundo tipo de proteínas posee estructura globular (*rojo*). Por motivos didácticos de mayor claridad, la razón de fosfolípido a proteína es mucho mayor en la ilustración que en una membrana natural. Las moléculas rígidas de colesterol (*amarillo*) tienden a mantener relativamente fijas y ordenadas las colas de los fosfolípidos de la membrana en regiones próximas a las cabezas hidrofílicas; las partes de las colas inmediatas al corazón de la membrana se agitan libremente. Las moléculas de azúcar de las cadenas laterales adheridas a proteínas y lípidos se han coloreado arbitrariamente en verde.

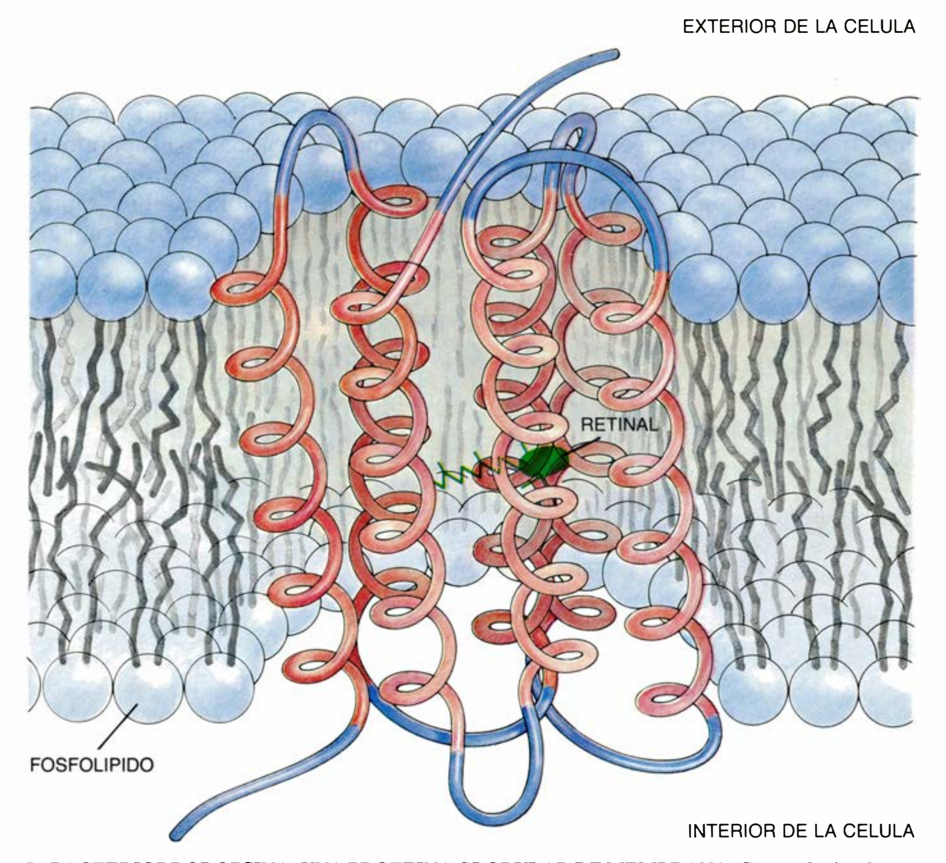
mucho para formar un órgano compacto.

Las capas epiteliales poseen dos superficies. En el tubo digestivo, por ejemplo, una superficie (la apical) da al tracto digestivo y la otra (la basolateral) da a la sangre. Las células que forman la capa epitelial del tubo digestivo han de estar fuertemente unidas entre sí, sin que medien intersticios, pues estas células han de transportar materiales útiles –y solamente materiales útiles– desde el intestino hasta la sangre. Por consiguiente, las células se unen entre sí mediante las llamadas uniones estrechas.

Podríamos imaginarnos la unión estrecha como un cinturón circular o junta que reside en la membrana plasmática. El cinturón no sólo impide fugas (incluso fugas de iones), sino que divide también la membrana plasmática celular en dos dominios: la superficie apical y la superficie basolateral. Las proteínas de membrana pueden merodear al azar dentro de su propio dominio, pero la unión estrecha les impide el desplazamiento de un dominio a otro.

La separación entre las dos partes de la membrana mantiene la asimetría funcional que se precisa para transportar material según una dirección única. Por ejemplo, en la superficie apical de la capa epitelial del tubo digestivo cada célula contiene proteínas que canalizan sodio desde el tubo digestivo hacia el interior de la célula. En la membrana basolateral se encuentra un conjunto diferente de proteínas que bombean el sodio desde la célula hacia la sangre. El resultado neto es una transferencia extremadamente selectiva de iones sodio a través de la capa epitelial; y se lleva a cabo porque las proteínas específicas necesarias para cada etapa de la transferencia se concentran en la parte de la superficie membranar donde pueden desempeñar su función.

¿Cómo se forman estas uniones estrechas? ¿Cómo distribuyen las células epiteliales sus proteínas de membrana en dos dominios? No hay respuesta todavía para la primera cuestión. Por lo que concierne a la segunda, comienza ya a esbozarse una gracias a nuevos planteamientos basados en cierto descubrimiento de Enrique Rodríguez Boulan y David D. Sabatini, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Nueva York. En 1978, observaron que, cuando se infectaba una capa epitelial que crecía en cultivo con virus de la gripe, los virus de la progenie salían sólo por la superficie apical de la capa. En cambio, el virus vesicular de la estomatitis (VSV), que origina una enfermedad benigna en el ganado vacuno, salía sólo por la superficie basolateral. Los virus debían fabricar una cubierta protectora para abandonar la célula huésped, por cuya razón Rodríguez Boulan y Sabatini dedujeron que la célula dirigía las proteínas de la cubierta del virus de la gripe a la superficie apical y las proteínas de la cubierta del VSV a la superficie basolateral. Ambos virus constituían, por tanto, un sistema experimental con el que estudiar fácilmente el desarrollo de asimetría en células epiteliales.



5. BACTERIORRODOPSINA: UNA PROTEINA GLOBULAR DE MEMBRANA. Consta de siete largas secuencias hidrofóbicas de aminoácidos, unidas por otras hidrofílicas más cortas. Gracias a los descubrimientos de Nigel Unwin y Richard Henderson, en el Laboratorio de Biología Molecular de Cambridge cuando realizaron el trabajo, podemos afirmar que cada una de las siete secuencias hidrofóbicas es una hélice alfa (*rojo*) empotrada en el núcleo hidrocarburado de la membrana, y que las secuencias hidrofílicas unen a las hélices entre sí, a cada lado de la membrana (*azul*). El retinal (*verde*) es una molécula adherida a la zona media de la hélice. El retinal captura fotones solares, promoviendo que la proteína bombee protones a través de la membrana de ciertas bacterias halófilas. El proceso pone en movimiento un tipo poco común de fotosíntesis. Las esferas azules y sus colas representan la bicapa fosfolipídica de la membrana bacteriana.

Las células que forman una capa epitelial pueden también enlazarse entre sí a través del llamado *nexus*. La unión *nexus* consta de dos agrupaciones de estructura radial, situadas una a continuación de otra y con un agujero a través de sus centros [*véase la figura* 7]. El agujero permite la comunicación y coordinación de actividades entre células vecinas. Las moléculas pequeñas cuyo diámetro sea inferior a 20 angstrom pasan libremente del citoplasma de una célula al de otra a través del conducto formado por el *nexus*.

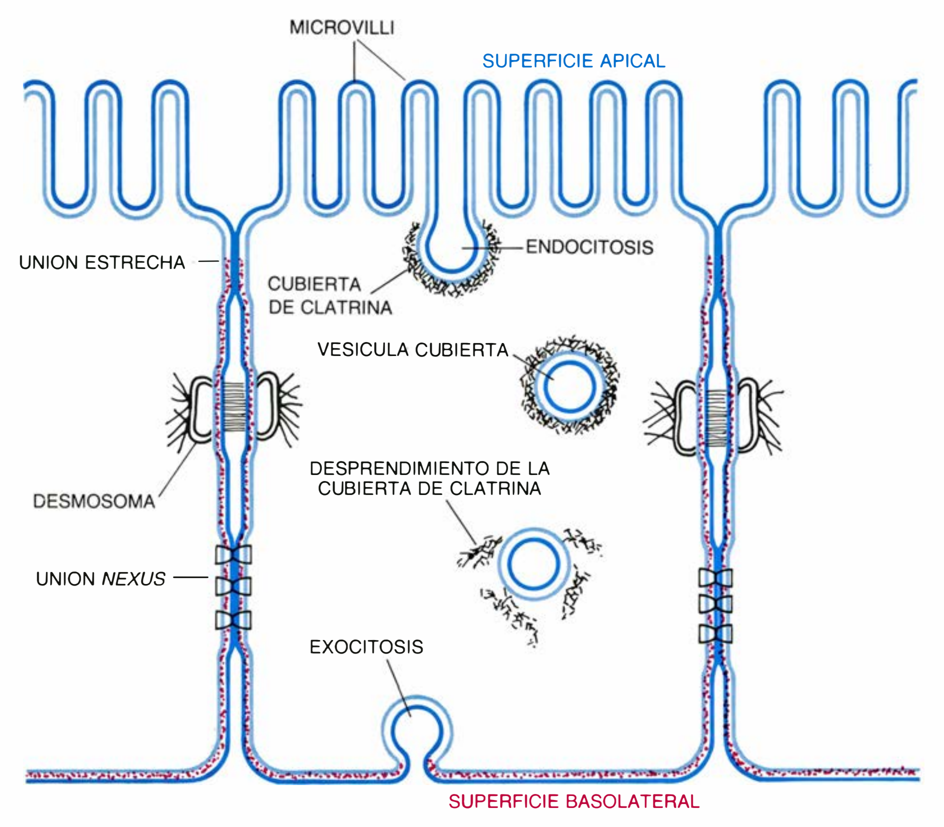
A Unwin, de la Universidad de Stanford, y sus colaboradores debemos el desentrañamiento de la estructura de las uniones *nexus*. Su trabajo demuestra que cada unión está constituida por 12 subunidades proteicas, seis en cada célula. Cada grupo de seis dibuja un hexágono en la membrana plasmática de estas dos células yuxtapuestas; los dos hexágonos se sueldan entre sí para formar un canal entre las células. El canal puede mantenerse abierto o cerrado, pero se desconoce cómo se consigue este control. Las uniones *nexus* interaccionan frecuentemente entre sí formando una balsa, es decir, un grupo grande de uniones, sobre la superficie celular. El tamaño del agregado que crea esta balsa y su confinamiento en las regiones de membrana entre dos células permite, verosímilmente, que las uniones *nexus* se mantengan relativamente inmóviles dentro de la bicapa líquida.

Hasta este momento he evitado voluntariamente cualquier referencia pormenorizada a las muchas membranas de que consta la célula eucariota, además de la plasmática. Recuérdese, no

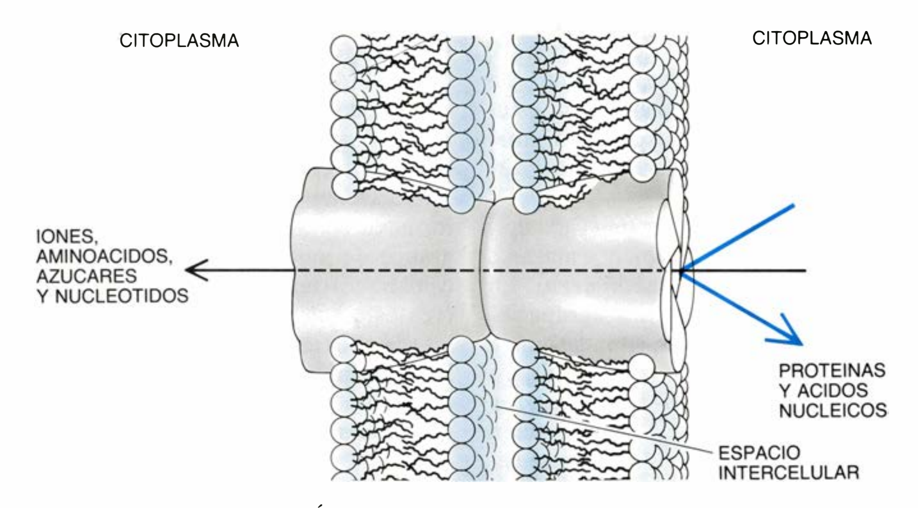
obstante, que muchos orgánulos intracelulares quedan definidos por una membrana limitante y que tales membranas desempeñan un papel esencial en el transporte, comunicación y procesamiento ordenado de sustancias químicas e información en el interior celular.

Algunos de los principales orgánulos intracelulares participan en la fabricación de componentes de membrana. Las membranas se ensamblan en el retículo endoplasmático; en el aparato de Golgi se añaden oligosacáridos a las proteínas de membrana. Por tanto, las relaciones entre muchos orgánulos no son estáticas, en absoluto. Hay, por ejemplo, una continua transferencia de membrana desde el retículo endoplasmático hasta el aparato de Golgi, y desde allí hacia la membrana plasmática. Las transferencias, probablemente, se realizan siempre por medio de vesículas fosfolipídicas.

Tales movimientos continuos de material de membrana, así como las fusiones y disociaciones de membranas vesiculares que acompañan al movimiento, plantean de nuevo la cuestión de la integridad de membrana. ¿Cómo evitan la mezcla y homogenización, durante una transferencia, determinadas proteínas de membrana destinadas a un orgánulo específico o pertenecientes a él? Carecemos todavía de una respuesta cabal. Si bien no hay duda de que lo que se transfiere no es una parte cualquiera, al azar, de la membrana donante. Existe un proceso de transferencia de materia que involucra a dos membranas, del que se está comenzando a conocer la manera en que esto ocurre. Me refiero a la endocitosis.



6. CELULA EPITELIAL con las partes adyacentes de sus dos vecinos inmediatos. Tales células forran el tubo digestivo y forman capas separadoras en otros órganos internos; en el tubo digestivo constituyen una barrera hermética entre el tubo digestivo y la sangre. El sellado se lleva a cabo por la unión estrecha; ésta separa también la superficie apical, que da al tubo digestivo, de la superficie basolateral, que da a la sangre. Debajo de la unión estrecha hay un desmosoma, que suelda a las dos células adyacentes; bajo el desmosoma se establece una unión *nexus*, que permite el paso directo de pequeñas moléculas desde el citoplasma de una célula hasta el de la célula vecina. Los nutrientes del tubo digestivo cruzarán la capa epitelial a condición de que los absorba antes una célula epitelial. Algunas macromoléculas pueden captarse mediante endocitosis. La vesícula endocítica descarga entonces su contenido en la corriente sanguínea por exocitosis sobre la superficie basolateral de la célula. La membrana apical y la basolateral tienen diferente dotación proteica.

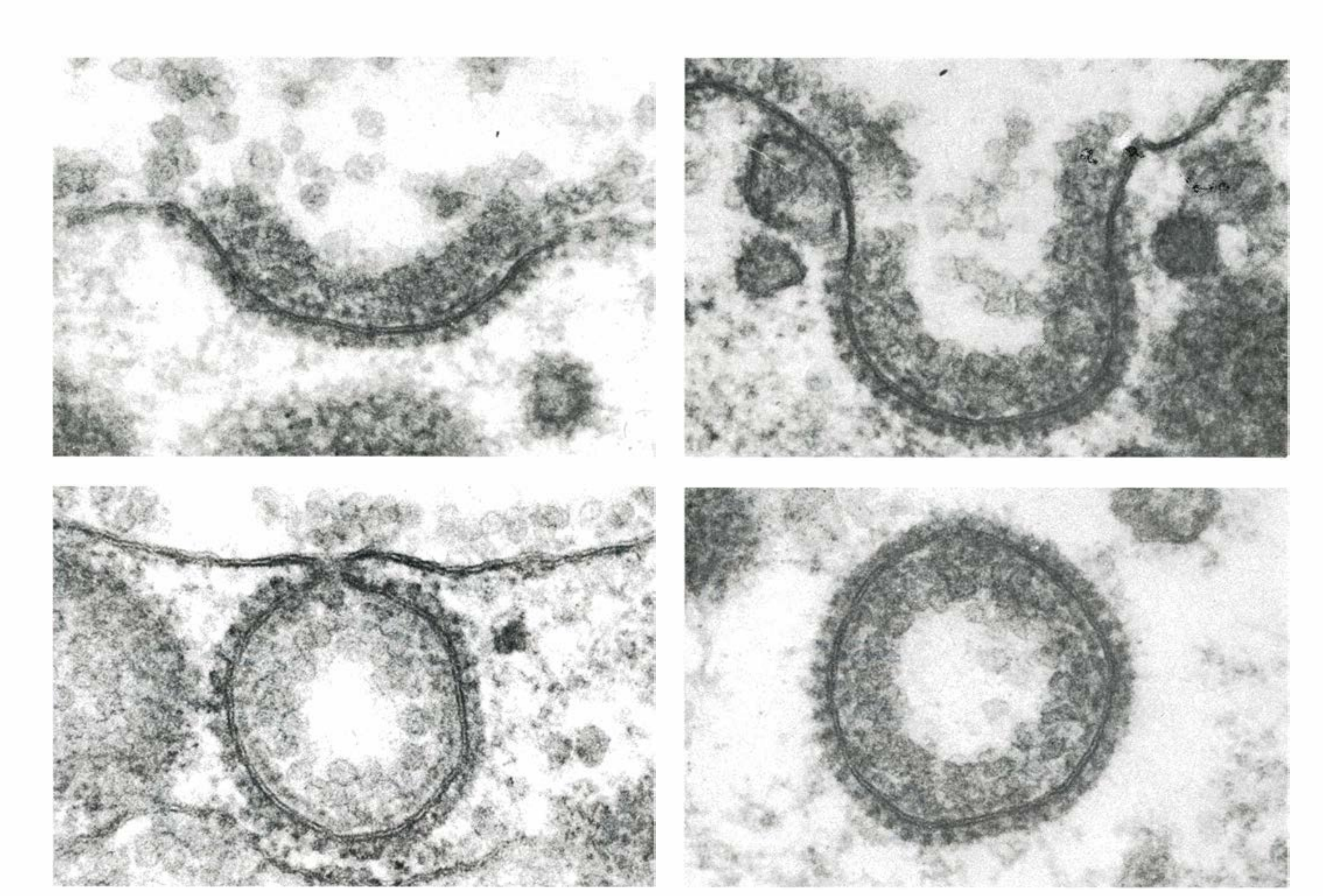


7. UNION NEXUS ENTRE DOS CÉLULAS EPITELIALES opuestas. Dicha juntura está formada por dos agregados hexagonales (*gris*), empotrado cada uno en la bicapa membranar de una célula (*esferas azules con colas adheridas*); los dos agregados se comprimen entre sí en el conducto entre las células. Iones, aminoácidos, azúcares, nucleótidos y otras moléculas inferiores a los 20 angstrom de diámetro pasan a través de la unión; las proteínas, los ácidos nucleicos y otras moléculas mayores no pueden hacerlo, sin embargo.

Las células animales obtienen la mayor parte de las moléculas pequeñas que precisan para su desarrollo sintetizándolas o importándolas de la sangre. Las moléculas importadas suelen atravesar la membrana plasmática por canales proteicos o bombeadores específicos. Sin embargo, algunos nutrientes esenciales, por una u otra razón, no pueden absorberse tan fácilmente.

En este sentido, tanto el colesterol (que se precisa para la síntesis de membranas) como el ion férrico (un átomo de hierro con tres cargas positivas, necesario para la síntesis de las grandes moléculas pigmentadas llamadas citocromos), circulan por la sangre en grandes complejos. El colesterol viaja en la forma de ésteres de colesterilo, que constituyen el núcleo hidrofóbico de una partícula denominada lipoproteína de baja densidad (LDL), de unos 200 angstrom de diámetro. Los iones férricos se encuentran en la sangre, unidos, dentro de una proteína transportadora llamada transferrina. Ambas, LDL y transferrina, son demasiado grandes para pasar a través de un pequeño canal o bomba; por ello, la célula ha de adoptar una estrategia radicalmente diferente para obtener los nutrientes que precisa.

La descripción actual de cómo esos nutrientes penetran en la célula arranca del trabajo realizado en 1964 por Thomas F. Roth y Koith R. Porter, entonces en Harvard. Estaban estudiando la forma en que oocitos de mosquito en



8. SECUENCIA DE FASES en la formación de una vesícula cubierta, puesta de manifiesto en esta serie de micrografías. El leve abombamiento de la membrana plasmática de un oocito de gallina en desarrollo (*arriba a la izquierda*) es una caveola; tiene asociadas muchas partículas de una lipoproteína recogidas del entorno de la célula; debajo mismo de la caveola, en el lado citoplásmico de la membrana, se distingue una cubierta de moléculas de clatrina. La caveola se hace más profunda (*arriba a la derecha*), la membrana externa de la célula se cierra tras la caveola (*abajo a la izquierda*) y la caveola se desprende para formar una vesícula cubierta que transporta las moléculas lipoproteicas hasta el interior de la célula (*abajo a la derecha*). M. M. Perry y A. B. Gilbert, del Centro de Investigaciones Avícolas del Consejo de Investigación Agrícola de Edimburgo, son los autores de las micrografías. La ampliación es de 135.000 aumentos.

crecimiento producían la yema del oocito. Mientras examinaban cortes delgados de oocitos al microscopio electrónico, observaron que el material precursor de la yema estaba unido a la membrana plasmática del oocito en sitios donde la membrana presenta indentaciones a la vez que posee una capa gruesa y oscura de material sobre la cara que da al citoplasma. Estos sitios se llaman caveolas. En los mismos cortes delgados de oocitos, Roth y Porter encontraron vesículas dentro de la célula que estaban llenas de precursores de la yema y que recubrían su superficie externa de gruesas envolturas. Denominaron vesículas cubiertas a estas estructuras. Las vesículas cubiertas provienen de la gemación de las caveolas hacia el interior de la célula; actúan de intermediarios, dentro del citoplasma del oocito, en la transferencia de los precursores de la yema desde el exterior de la célula hasta los grandes gránulos de yema almacenados dentro del oocito.

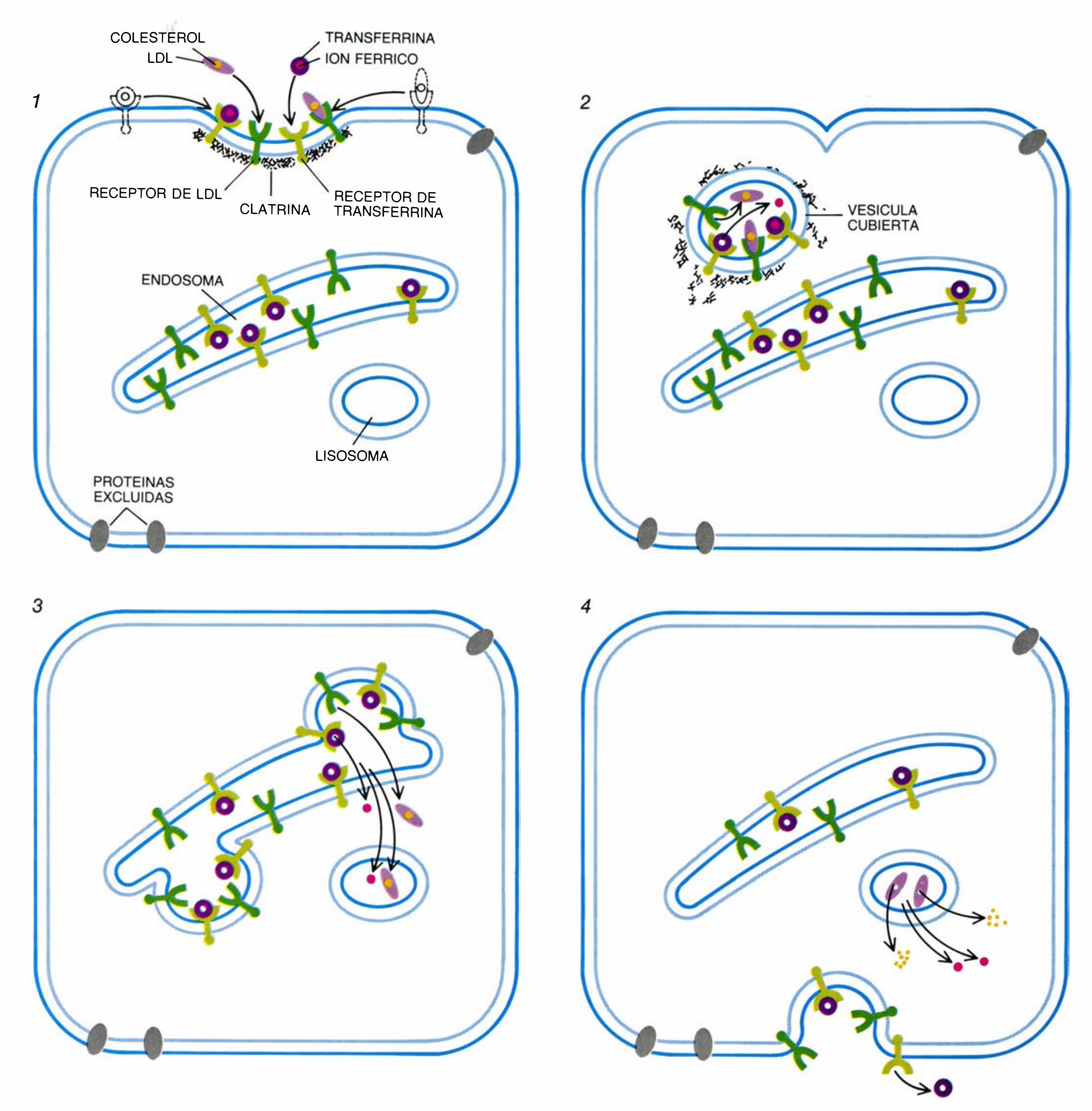
Otros trabajos recientes sobre la captación de LDL de Richard G. W. Anderson, Michael S. Brown y Joseph L. Goldstein, del Centro de Ciencias de la Salud de la Universidad de Texas en Dallas, y de muchos otros grupos, incluido el que yo dirijo, que estudió la captación de transferrina y otras grandes moléculas, han trazado un perfil coherente de las primeras fases de la endocitosis, que se inician en las caveolas. Sobre la superficie externa de la mayoría de las células animales en crecimiento se encuentran receptores proteicos específicos para LDL, para transferrina y para otras grandes moléculas importadas. A medida que discurren por la superficie celular, los receptores pueden enlazarse a la LDL o la transferrina.

Cuando un receptor de LDL o transferrina se encuentra con una caveola, se adentra en su interior. Pero otras proteínas del plasma quedan excluidas de la caveola, que actúa así como un mecanismo selector de moléculas. La caveola tarda un minuto aproximado en alcanzar su diámetro completo de unos 0,3 micrometros. En ese momento, la caveola se invagina y se desprende de la membrana plasmática emigrando al citoplasma, donde forma una vesícula cubierta. Se supone que la cubierta del lado citoplásmico de la caveola proporciona la fuerza mecánica que gobierna el proceso.

La vesícula cubierta, una vez formada en el citoplasma, se desprende de su envoltura en pocos segundos. Ocurren entonces dos cosas. La vesícula se fusiona con un orgánulo intracelular llamado endosoma, cuya acidez interior se incrementa hasta un *p*H de 5 aproximadamente. La acidez ambiental provoca que la LDL se separe de su receptor y los iones férricos se disocien de la transferrina. Los receptores de LDL y de transferrina (los últimos con su ligando, transferrina, aún unido) se reciclan, yendo a la membrana plasmática, por procesos desconocidos. Al mismo tiempo, se transfieren a los lisosomas las LDL, los iones férricos y otras sustancias del endosoma, también mediante transporte vesicular. El lisosoma es un orgánulo de digestión primitivo, que degrada las LDL, libe-

rando así el colesterol necesario para la célula. Nótese que, en esta etapa, colesterol e iones férricos han de transportarse aún a través de una membrana al menos, concretamente la del lisosoma, para poder alcanzar sus puntos de destino dentro de la célula.

El ciclo endocítico iniciado en las caveolas da una visión dinámica de la célula. En toda célula que se desarrolle en un cultivo, aproximadamente un 2 por ciento de la superficie lo están engullendo caveolas en invaginacción en cualquier instante que consideremos. Ante semejante flujo de membrana desde la plasmática hasta el compartimento endosómico, para tornar luego al origen, podría esperarse que los componentes proteicos de las dos membranas acabaran pronto por ser idénticos. No ocurre, sin embargo, esa mezcla: las caveolas seleccionan únicamente ciertas proteínas de la membrana plasmática para introducirlas en la célula. Se cree que el mismo conjunto de proteínas, que residan en la membrana endosómica, se reciclarán hasta la plasmática por un proceso selectivo similar. Esta transferencia selectiva de membrana mediada por ca-



9. CICLO GENERAL de endocitosis y exocitosis, ilustrado en cuatro etapas. Los iones férricos de las moléculas de transferrina y el colesterol de partículas lipoproteicas de baja densidad (LDL) se enlazan a receptores de la membrana plasmática. Los receptores que llevan transferrina y LDL se difunden hasta una caveola, que bloquea la entrada de otros tipos de proteínas de membrana (*1*). Después, la caveola gema hacia el interior celular, transformándose en una vesícula cubierta; ésta se despoja de su cubierta de clatrina. Mientras tanto, una acidificación creciente comienza a liberar a las LDL de su receptor y a los iones férricos de la transferrina (*2*). La vesícula liberada se fusiona entonces con un endosoma, que lleva ya receptores procedentes de ciclos anteriores de endocisis. Los iones férricos y las LDL liberadas se transfieren a un lisosoma. Se muestra también una vesícula separándose por gemación del endosoma (*3*). La vesícula, que lleva receptores de LDL vacíos y transferrinas sin hierro aún unidas a sus receptores, se fusiona de nuevo con la membrana plasmática; los receptores entran en un nuevo ciclo de endocitosis (*4*). El colesterol se libera de la LDL en el lisosoma; los iones férricos y el colesterol se transportan a otros puntos.

veolas explicaría la forma de mantener la integridad de numerosos y distintos compartimentos de membrana, a pesar del continuo tráfico entre ellos. Adviértase también que durante el ciclo endocítico la topología y asimetría de la membrana se mantienen siempre.

No negamos que nuestro conocimiento de cómo seleccionan las caveolas a las proteínas de la membrana plasmática es incompleto. Pero se ha avanzado bastante gracias a los estudios estructurales de las vesículas cubiertas, muy emparentadas con ellas. Barbara M. F. Pearse, del Laboratorio de Biología Molecular, aisló en 1976 vesículas cubiertas y demostró que la envoltura era una malla formada por una proteína fibrosa y grande, a la que denominó clatrina. Tales vesículas cubiertas llevan también receptores, moléculas de ligandos unidas a los receptores y otras muchas proteínas que pueden mediar en la interacción entre la clatrina y los receptores. Las vesículas cubiertas no sólo las genera la membrana plasmática, sino que también lo hacen orgánulos intracelulares, como el aparato de Golgi. De ahí que se tenga fundadas esperanzas de desentrañar pronto el mecanismo de selección.

La imagen de la membrana plasmática que se perfila a partir de este trabajo es la de una bicapa lipídica atravesada de lado a lado por diferentes proteínas que residen en ella. Algunas se limitan a catalizar la transferencia de pequeñas moléculas a través de la bicapa; poseen una estructura globular. Otras constan de un solo segmento helicoidal hidrofóbico, que las sujeta a la membrana; algunas de las proteínas helicoidales son receptores que aportan macromoléculas a la célula. Mientras que todas estas moléculas, o casi todas, se difunden libremente por la bicapa líquida, otras estructuras (tales como las uniones *nexus* y las uniones estrechas) permanecen relativamente estáticas. Lo que contrasta con el movimiento dinámico de la membrana durante el ciclo endocítico.

Las membranas plasmáticas participan en muchas funciones celulares de las que no nos hemos ocupado aquí. Puesto que forman la interfase entre una célula y el resto del organismo, han de estar implicadas en el movimiento de las células y en la manera en que se dirige el movimiento durante el crecimiento y el desarrollo. La membrana plasmática interviene también en el crecimiento canceroso, en el que la multiplicación y migración celular puede quedar fuera de control.

Moléculas de la matriz celular

Las proteínas del citoplasma crean una matriz muy estructurada, aunque cambiable, que afecta a la forma de la célula, a su división y movimiento, así como al transporte de vesículas y orgánulos. ¿Interviene en el metabolismo?

Klaus Weber y Mary Osborn

El citoplasma de la célula no es ninguna masa amorfa y gelatinosa donde anden diseminados el núcleo y el resto de orgánulos. Antes bien, goza de una refinada estructura. Una matriz fibrosa de proteínas se extiende por el citoplasma entre el núcleo y la cara interna de la membrana plasmática, ayudando a definir la forma de la célula e interviniendo en la locomoción y división celulares. Conocida con el nombre de citoesqueleto, la matriz podría condicionar también el movimiento de los orgánulos del interior de la célula e incluso dejarse sentir en el metabolismo de ésta al aportar un marco tridimensional para los acontecimientos moleculares que constituyen los procesos vitales celulares.

Durante el siglo XIX los microscopistas observaron ya fibras en el citoplasma de algunos tipos celulares. Más tarde se emplearon, entre otras, tinciones de plata para realzar en el microscopio óptico las fibras del citoesqueleto. En los años cincuenta y sesenta de nuestro siglo, la microscopía electrónica sacó a la luz tres sistemas distintos de filamentos del citoplasma. Estudios bioquímicos e inmunológicos más recientes han identificado el conjunto específico de proteínas que caracteriza a cada sistema de filamentos.

La morfología ultraestructural y la bioquímica corroboran y perfilan esos tres sistemas. Las fibras más delgadas son los microfilamentos, con una media de seis nanómetros de diámetro (milmillonésimas de metro); están formados por la proteína actina. Los microtúbulos miden 22 nanómetros de diámetro y constan de tubulina. El diámetro de los filamentos intermediarios, el tercero de los sistemas, se sitúa entre siete y once nanómetros; según el tipo celular, varían sus proteínas constituyentes.

Las proteínas características de cada sistema de filamentos pueden purificarse en el laboratorio; ello posibilita el recurso a la microscopía de inmunofluorescencia para obtener una visión general de la configuración de cada tipo de filamento dentro de la célula. Utilizada por primera vez sobre un componente del citoesqueleto (el sistema de microfilamentos), en 1974, la técnica requiere un anticuerpo contra una proteína específica. El anticuerpo se prepara inyectando la proteína purificada en un animal de experimentación. Luego, se deja que el anticuerpo se una a la proteína efectora (*target*) de una célula fijada introduciendo aquél a través de poros abiertos en la membrana plasmática. A continuación, se expone la célula a un segundo anticuerpo, que reconoce al primero y que se ha marcado con una sustancia fluorescente. Si observamos entonces la célula al microscopio de fluorescencia, veremos cómo el anticuerpo fluorescente unido realza la distribución del primer anticuerpo y con ello la proteína a la que está unido.

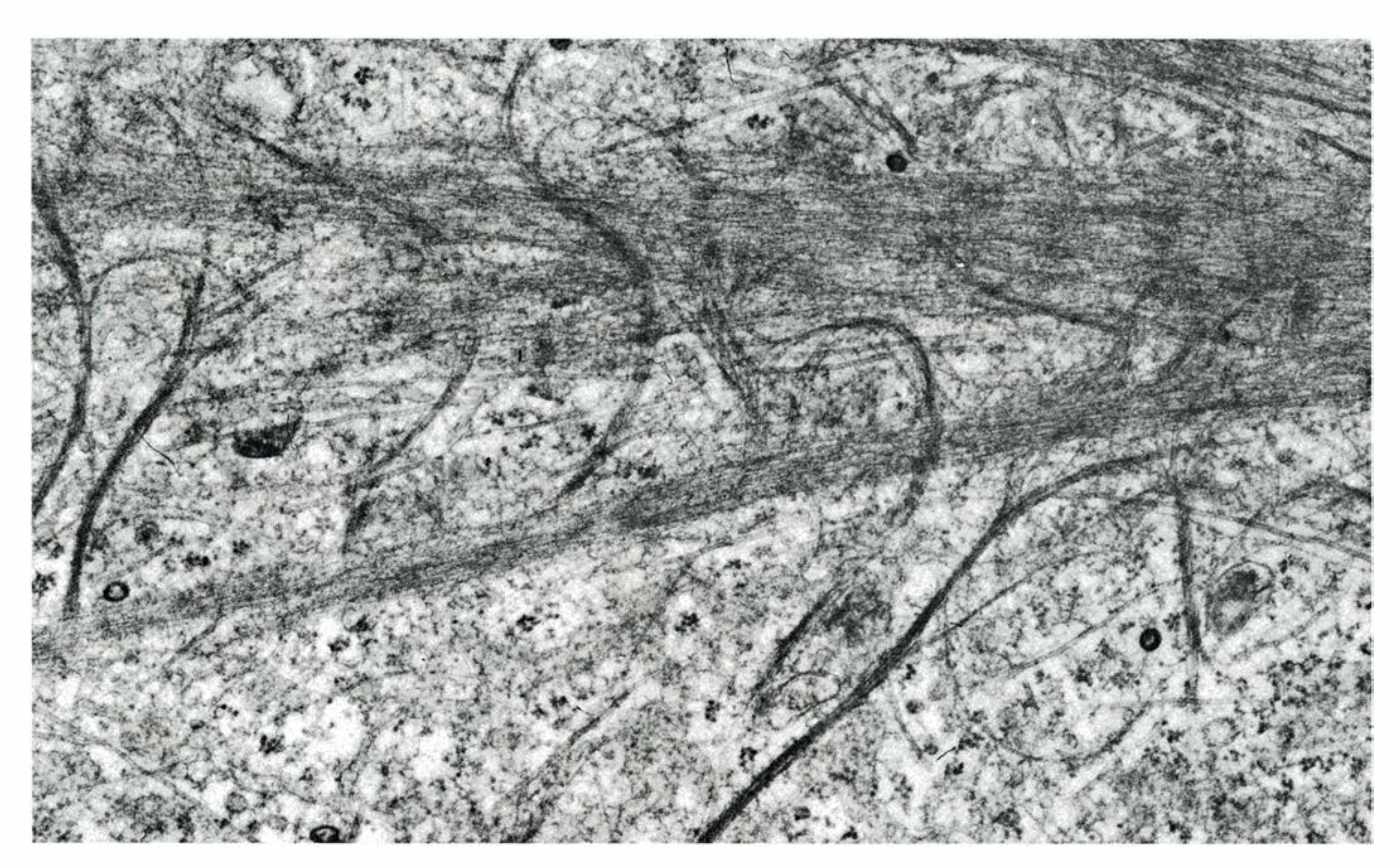
Cuando el primer anticuerpo es específico de la actina, el marcador fluorescente revela una formación de "fibras de refuerzo": largos y espesos haces de microfilamentos que discurren paralelos a la membrana plasmática, por el interior de la misma. Las fibras de refuerzo destacan, de una manera señalada, en células bien extendidas: las que se hallan lisamente aplanadas sobre un substrato. Muchas células normales y otras que un virus tumoral ha transformado presentan una forma redondeada y carecen de fibras de refuerzo. El anticuerpo revela, asimismo, una fina red de microfilamentos por debajo de la membrana; red que se distingue fácilmente en el "borde fruncido" de la célula fijada, que marca el frente de avance de una célula viva en su desplazamiento sobre un substrato.

El anticuerpo específico de la tubulina nos pone de manifiesto una organización muy diferente. Los microtúbulos que realza no se concentran cerca de la membrana plasmática; antes bien, arrancan de un centro de organización cercano al núcleo: el llamado centrosoma o citocentro, que consta de dos estructuras cilíndricas y compactas, los centriolos, y de un material circundante. Cada microtúbulo discurre desde los centriolos hasta debajo mismo de la membrana plasmática. A diferencia de lo que ocurre con las fibras de refuerzo, los microtúbulos radiales no desaparecen cuando una célula bien extendida adopta una forma más redondeada, aunque cambian forzosamente en su dimensión longitudinal. Sin embargo, con el microscopio de fluorescencia resulta más difícil distinguir microtúbulos vecinos en una célula esferoidal que en otra extendida, lo que podría explicar la creencia errónea de que el complejo microtubular se rompe y pierde definición en las células transformadas.

Al iniciarse la mitosis, el proceso de división celular, asistimos a una sorprendente reorganización del complejo

1. RED DE PROTEINAS en el citoplasma de un fibroblasto, una célula del tejido conjuntivo, que la microscopía de fluorescencia nos pone de manifiesto. El color azul indica la distribución de la actina, la proteína estructural de los microfilamentos, que fue teñida con el producto fluorescente faloidina. El color rojo marca la distribución de la vinculina, proteína que está asociada con la actina; el verde, la disposición de la tubulina, proteína estructural de los microtúbulos. La distribución de la vinculina y tubulina se registró inmunológicamente: se utilizó anticuerpo contra cada proteína para marcarla con un compuesto fluorescente. J. Victor Small y Gottfried Rinnerthaler, del Instituto de Biología Molecular de Austria, construyeron esta imagen tomando por separado tres micrografías de la célula en blanco y negro, en cada una de las cuales sólo se dejaba ver una de las proteínas. Pasaron luego las imágenes a través de filtros de color y las combinaron. Las áreas blancas son un artefacto y, las regiones amarillas, el resultado de la superposición de colores.





2. FILAMENTOS DE PROTEINA que se entrelazan en el citoplasma de una célula epitelial de rata canguro, aumentados 38.000 veces. (Las células epiteliales conforman las capas superficiales de la piel y el revestimiento intersticial.) Por su diámetro y aspecto nos es dado distinguir entre los tres tipos de filamentos de la matriz celular. Las fibras rectas que atraviesan la micrografía en forma de haces gruesos son microfilamentos. Miden seis nanómetros de diámetro y están constituidos por la proteína actina. Los haces se denominan fibras de refuerzo. Las fibras sueltas, más gruesas, que recuerdan raíles de tren, son microtúbulos. Su diámetro alcanza unos 22 nanómetros y están formados por tubulina. Los haces curvados, de filamentos intermediarios, poseen un diámetro que oscila entre siete y once nanómetros. Su proteína varía según el tipo de célula; en las epiteliales es la queratina. David Henderson es autor de esta micrografía.

microtubular. La microscopía de inmunofluorescencia muestra que, cuando los cromosomas del núcleo se condensan y empiezan a separarse en dos juegos, se rompen los microtúbulos y se reconstruye la tubulina para formar el huso mitótico: una red de microtúbulos paralelos que se extiende desde los polos de la célula en división hacia los cromosomas situados en el centro y se tensa de polo a polo. El huso dirige, y probablemente suministra, la fuerza impulsora para el movimiento de los dos juegos de cromosomas hacia los polos. Al elemento citoesquelético débese la correcta división del material genético de la célula progenitora entre las dos células hijas.

El anticuerpo necesario para observar el tercer sistema de la célula, los filamentos intermediarios, varía según su proteína constituyente, que depende, a su vez, del tipo celular. De acuerdo con su bioquímica variable, la disposición de los filamentos intermediarios difiere en los distintos tejidos. (Algunas células parecen carecer totalmente de ellos.) Los filamentos intermediarios, que suelen ocupar el citoplasma entero, se agrupan en ciertas células y en otras se distribuyen en filamentos sueltos. En muchos tipos celulares, su organización parece estar relacionada con la de los microtúbulos.

La microscopía de inmunofluorescencia constituye un poderoso instrumento para el estudio de la organización general de los filamentos del citoesqueleto, además de haber dado pruebas de su eficacia en la determinación de qué otras proteínas están asociadas con los diferentes sistemas de filamentos. Con el dominio hábil de la técnica, se logran incluso imágenes que registran tres proteínas en una sola célula o imágenes estereoscópicas que producen sensación de tridimensionalidad.

La microscopía electrónica aporta una resolución mejor que la microscopía de inmunofluorescencia. Ahora bien, un corte preparado para microscopía electrónica convencional tiene sólo dos centésimas partes del grosor de una célula, por cuya razón no proporciona una visión global de la organización citoesquelética. Los modernos microscopios electrónicos de alto voltaje de aceleración pueden utilizarse para el estudio de cortes más gruesos, en los que las fibras individuales del citoesqueleto se siguen a través de largos recorridos. Se observa también la organización del citoesqueleto a gran escala con el microscopio electrónico tratando las células con un detergente suave. Este perfora la membrana plasmática y extrae del citoplasma muchas proteínas solubles, pero deja intactos los microfilamentos, los microtúbulos y los filamentos intermediarios. No es necesario hacer cortes de estas preparaciones para su observación al microscopio electrónico.

La configuración de los elementos citoesqueléticos se pone asimismo de relieve mediante criosublimación profunda: congelación rápida y fractura de una célula, sublimación al vacío de su contenido en hielo y posterior recubrimiento con una delgada capa de platino. El espécimen tratado de este modo ofrece, en el microscopio electrónico, unas imágenes espectaculares de apariencia tridimensional del citoesqueleto al descubierto. La microscopía

electrónica ha logrado también la especificidad bioquímica de la microscopía de inmunofluorescencia mediante el empleo de anticuerpos marcados con una sustancia densa a los electrones, como la ferritina o el oro coloidal; su distribución en una micrografía indica la distribución de la proteína efectora.

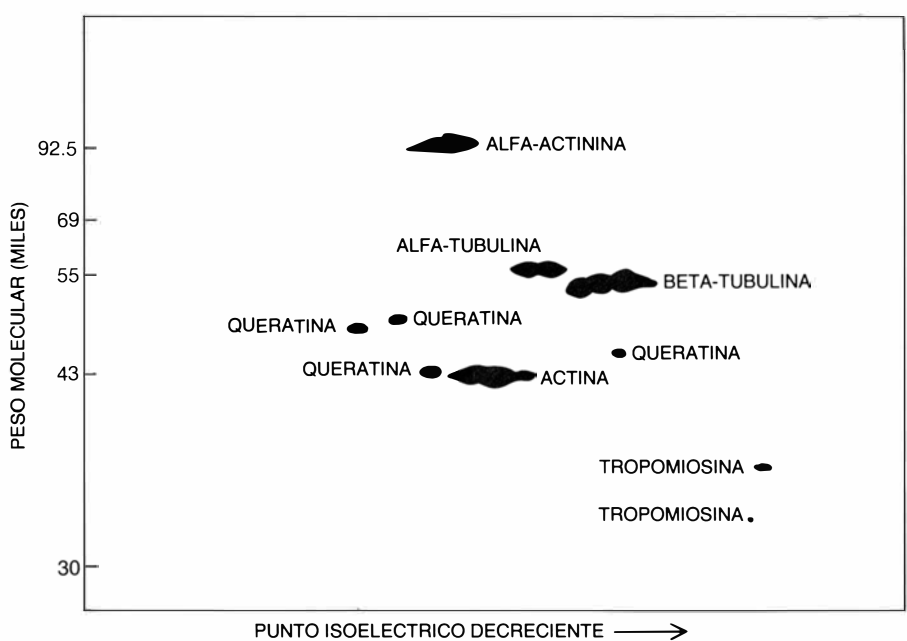
Las técnicas hasta ahora expuestas se limitan a ofrecernos una visión estática del citoesqueleto, una instantánea fotográfica de la célula en el momento de su fijación. Otras técnicas han empezado a revelar el comportamiento del citoesqueleto en la célula viva. En el tubo de ensayo puede marcarse químicamente una proteína del citoesqueleto con una sustancia fluorescente, para inyectarla luego directamente en una célula mediante una aguja de vidrio muy fina. El marcador fluorescente permite seguir la incorporación de la proteína en la matriz citoplasmática a través de una cámara de vídeo con intensificador de imagen. Para valorar el papel desarrollado por una determinada proteína de la matriz en el comportamiento y fisiología de la célula, puede inyectarse anticuerpo contra la proteína. Con frecuencia, el anticuerpo inactivará la proteína. El funcionamiento de la célula inyectada nos señalará entonces qué misión cumple la proteína en células normales.

Con el fin de determinar la base molecular de la estructura y comportamiento revelados por estas técnicas microscópicas, se cotejan las observaciones con los resultados derivados de estudios bioquímicos. Los ensayos in vitro, en los que se purifican las proteínas del citoesqueleto y se analizan sus interacciones mutuas, han posibilitado la descripción bioquímica de gran parte de lo que se observa bajo el microscopio. En este orden, se ha alcanzado un buen grado de caracterización de las proteínas que fundamentan la organización y dinámica de los microfilamentos.

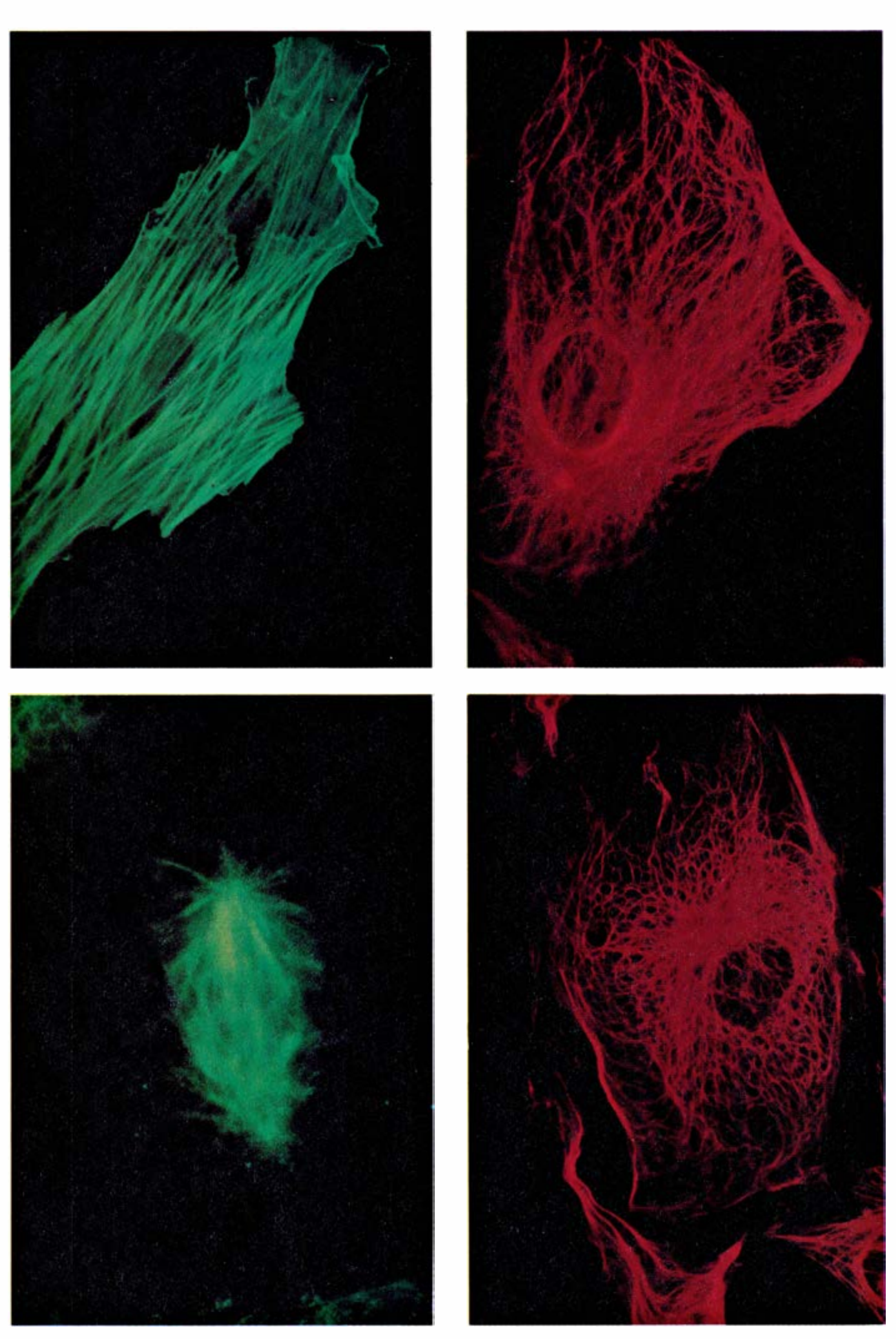
Por delante de todas, la actina. Esta proteína básica de los microfilamentos es, en su forma purificada, un monómero (unidad molecular que puede combinarse con unidades equivalentes para formar un polímero o cadena) conocido por actina globular, o actina G. En presencia de trifosfato de adenosina (ATP), sustancia celular para el suministro de energía, y de un tampón fisiológico, la actina G se polimeriza formando largas helicoides dobles, denominadas actina filamentosa o actina F. Simultáneamente, el ATP se convierte en difosfato de adenosina (ADP), liberando la energía necesaria para el proceso. La cadena de actina F presenta polaridad: tiende a polimerizarse, o alargarse, por un extremo (el extremo positivo) y a despolimerizarse, o acortarse, por el otro (el extremo negativo). Aunque la actina F es el principal elemento estructural de los microfilamentos, hay en el citoesqueleto otras proteínas, las así llamadas proteínas que se unen a la actina.

Las proteínas que se unen a la actina gobiernan la configuración y comportamiento de la actina F. Los análisis del músculo esquelético, de la musculatura lisa (involuntaria) y de diversos tejidos y células no musculares han corroborado ya la existencia de varias docenas de estas proteínas, y seguramente se encontrarán otras más. Algunas son peculiares de tipos celulares específicos, pero muchas son comunes a múltiples células distintas; todas, sin em-





3. PROTEINAS DE CELULAS EPITELIALES, clasificadas en un principio según la carga, expresada aquí como punto isoeléctrico (*de izquierda a derecha*), y luego de acuerdo con su peso molecular (*de arriba abajo*) por electroforesis en gel bidimensional. Se expusieron células vivas a una mezcla de aminoácidos marcados radiactivamente, que las células fueron incorporando en sus proteínas. Estas se separaron por electroforesis y se colocó una emulsión fotográfica sobre el gel. La radiactividad de las proteínas dio lugar a la imagen de la parte superior. Las proteínas citoesqueléticas son componentes principales de la célula. La actina, la tubulina y la queratina son, respectivamente, las proteínas básicas de los microfilamentos, de los microtúbulos y (en las células epiteliales) de los filamentos intermediarios. Las otras proteínas identificadas están unidas a las tres proteínas básicas. R. Bravo y J. E. Celis, de la Universidad de Aarhus, sacaron la imagen.



4. SISTEMAS DE FILAMENTOS DEL CITOESQUELETO. Presentan distintas configuraciones, que salen a la luz en las micrografías de inmunofluorescencia. Los microfilamentos (*arriba a la izquierda*) discurren paralelos a la membrana de la superficie celular formando haces, las llamadas fibras de refuerzo, que podrían desarrollar una misión contráctil. Debajo mismo de la membrana, los microfilamentos forman también una fina malla, vagamente perceptible aquí en el borde superior fruncido de la célula, que marcaba su borde de avance cuando estaba viva y era móvil. Los microtúbulos (*arriba a la derecha*), visibles individualmente en esta micrografía, se expanden desde una zona inmediata al núcleo, conocida como citocentro (*la región con mayor densidad*). Los microtúbulos podrían actuar de guías radiales para el transporte intracelular en la célula que no está en división; ahora bien, para la división celular se rompen y la tubulina se reconstruye formando los microtúbulos del huso mitótico, mostrado en una micrografía para cuya obtención se utilizó un compuesto fluorescente distinto (*abajo a la izquierda*). Los filamentos intermediarios (*abajo a la derecha*), como los microtúbulos, se extienden a través del citoplasma. En una célula epitelial, como la de la imagen, los filamentos intermediarios forman gruesos haces ondulantes, con la misión probable de constituirse en refuerzo estructural; en otros tipos celulares los filamentos intermediarios no están tan apiñados.

bargo, se denominan por sus efectos in vitro sobre la construcción y estructura de la actina. Los factores de gelificación aumentan notablemente la viscosidad de la actina F purificada; forman enlaces flexibles y ceñidos entre filamentos entrecruzados. Los factores formadores de haces, un conjunto de proteínas muy compactas, unen rígidamente fibras en paralelo, agavillando haces densos que se dejan ver en el microscopio óptico. Los factores de separación, en forma de varilla, establecen puentes entre filamentos de actina paralelos, uniéndolos a distancias de unos 200 nanómetros, quizás.

Los factores de fraccionamiento y estabilizadores no se unen a hebras múltiples de actina, sino a filamentos sencillos, gobernando su longitud y estabilidad. Parece que los factores de fraccionamiento se insertan entre las subunidades del filamento, dividiéndolo y formando un capuchón en el nuevo extremo positivo. Cuando se añaden factores de fraccionamiento a un gel de actina F, su viscosidad disminuye drásticamente al cortarse los filamentos. Los factores de estabilización contrarrestan la acción de los factores de fraccionamiento; conocidos también como proteínas cofilamentosas, se adosan a lo largo del filamento, protegiéndolo. La tropomiosina, una proteína filamentosa corta, podría actuar a modo de factor de estabilización para la actina F en células no musculares.

Hay más proteínas que gobiernan la fabricación de fibras de actina F. Debido a que las fibras de actina tienden a añadir subunidades de actina G en un extremo y a desprenderse del monómero en el otro, se produce un flujo de subunidades a través de la cadena cuando está en equilibrio con actina G libre. El proceso semeja el de una cinta transportadora; se regula por factores de fijación. Cada molécula fijadora es específica del extremo positivo o del negativo del filamento. Así, un factor de fijación interrumpe la adición de subunidades en el extremo del filamento o su eliminación, controlando de esta manera la cantidad de actina polimerizada.

Otro conjunto de proteínas que se unen a la actina e inciden en el equilibrio entre actina G y F se agregan, más que al polímero, al monómero. Conocidas como factores secuestrantes, forman un complejo con la actina G, cuya polimerización evitan así. Proporcionan una reserva de actina monomérica, que la célula puede utilizar cuando necesita formar nuevos filamentos.

¿De qué manera la célula controla la formación, unión, fijación y fraccionamiento de sus microfilamentos? Por lo menos algunas proteínas que se unen a la actina, sobre todo las proteínas de fraccionamiento y ciertas proteínas de fijación y separación, son reguladas por flujos del ion calcio, en quien se reconoce un importante mensajero celular. Los factores secuestrantes pueden responder a ciertos lípidos; in vitro, los lípidos provocan que los factores secuestrantes liberen su dotación de actina G unida. Resulta bastante probable que

algunas células controlen también la arquitectura de sus microfilamentos alterando las proporciones relativas de las proteínas que se unen a la actina.

Las proteínas que se unen a la actina no sólo influyen en la organización de la red de actina, sino también en su actividad. Por ejemplo, las proteínas de fijación y fraccionamiento pueden intervenir en algunos tipos de locomoción celular y en los movimientos que se desarrollan en el interior de la célula controlando el acortamiento y alargamiento locales de los filamentos de actina. El motor reconocido del movimiento celular y posiblemente de ciertos aspectos del transporte intracelular es otra proteína que se une también a la actina: la miosina. Con la actina, la miosina convierte energía química del ATP en movimiento contráctil. La miosina es de hecho una ATPasa, una enzima que degrada ATP en ADP. Su actividad se aviva cuando se une a la actina F.

La asociación de la miosina con la actina F está bien comprobada en las células musculares, donde las dos proteínas forman unidades contráctiles denominadas sarcómeros. El citoplasma de las células no musculares contiene una cantidad mucho menor de miosina en un estado mucho menos ordenado. La miosina no forma filamentos gruesos, bipolares (con doble cabeza), típicos del músculo; antes bien, se pierde morfológicamente en la jungla de la organización del citoesqueleto visible en las electromicrografías convencionales. Sin embargo, la microscopía de inmunofluorescencia confirma su presencia entre los microfilamentos.

La importancia de la miosina en la contracción puede demostrarse in vitro; y ha quedado evidenciada la probable bioquímica del proceso. Una vez más, un flujo de iones calcio actúa de disparador. La miosínquinasa, otra proteína asociada a los microfilamentos, junto con la calmodulina, sustancia que media en muchos de los efectos del calcio, altera la configuración de las moléculas de miosina. Se estiran y se agregan formando pequeños filamentos bipolares. Los iones calcio activan también factores de fraccionamiento que cortan áreas de la red de actina. Los filamentos bipolares de miosina se unen entonces por ambos extremos a filamentos de actina correctamente alineados; en presencia de ATP, los filamentos deslízanse uno a lo largo del otro. Las moléculas de miosina, adecuadamente ancladas, pueden fraccionar los distintos filamentos de actina.

La prueba directa de que la actina F y la miosina juntas convierten la energía química almacenada en forma de ATP en movimiento surge de un experimento reciente realizado con las proteínas purificadas. Agregóse a una membrana de carbón un sistema de filamentos de actina que discurrían en paralelo y presentaban idéntica polaridad. Se colocaron luego sobre la actina pequeñas perlas de poliestireno, a las que se habían unido moléculas de miosina. Cuando se añadió ATP al sistema, se observó que las perlas se movían a lo largo de los filamentos. El ritmo de avance era coherente con la velocidad de la contracción muscular y de ciertas formas de movimiento celular. Se desconoce, no obstante, cómo una célula viva traduce este movimiento, que acontece en el nivel molecular, en locomoción celular y en movimiento intracelular de los orgánulos.

La relación de la red de microfilamentos con la arquitectura de la célula se conoce mejor que el papel de la red en el movimiento. Los microfilamentos dominan la parte exterior del citoplasma; e influye, pues, en las características de la superficie celular. Un andamiaje especializado y formado de actina se extiende por debajo de la membrana plasmática de algunas células. En determinados casos se ha llegado a purificar y aislar el andamio entero. Las técnicas inmunológicas y bioquímicas han revelado la naturaleza bioquímica de la estructura de la proteína aislada.

Debajo mismo de la membrana plasmática de los glóbulos rojos, filamentos muy cortos de actina y una proteína que se une a la actina tejen una red bidimensional que parece explicar la flexibilidad celular, característica que les permite pasar por capilares extremadamente finos. Las cadenas de actina, que probablemente contienen sólo algo así como una docena de monómeros de actina, se sitúan en los nudos de la red. Se hallan interconectadas por largas moléculas de un factor de separación, la espectrina. Una tercera proteína, la anquirina, une los entrecruzamientos de la espectrina a una proteína transmembranal principal (una proteína que atraviesa la membrana plasmática) y ancla la red; otras proteínas estabilizan más aún la arquitectura básica.

La superficie expuesta de la célula epitelial del intestino presenta una topografía más compleja, bajo la cual se asienta un andamiaje citoesquelético más intrincado. Una sola célula ofrece unas 1000 expansiones digitiformes conocidas como microvilli, que aumentan el área de la superficie a cuyo través se absorben los nutrientes. Los microvilli están cargados de enzimas digestivas y sistemas bioquímicos de transporte que procesan los nutrientes. Cada microvillus se halla estabilizado por un haz de actina F, en el que las proteínas villina y fimbrina actúan de factores formadores de haces. Una serie de puentes dispuestos helicoidalmente enlazan el haz con la membrana plasmática del microvillus. La proteína de los puentes no se ha caracterizado todavía en toda su integridad, pero podría tratarse de una proteína transmembranar que se extiende hacia dentro hasta encontrar el haz de actina. En la base del haz, los filamentos están enraizados en una red horizontal que se cree está dominada por un factor de separación del tipo de la espectrina. La red mantiene a los numerosos filamentos centrales en su lugar, estabilizando con ello los microvilli.

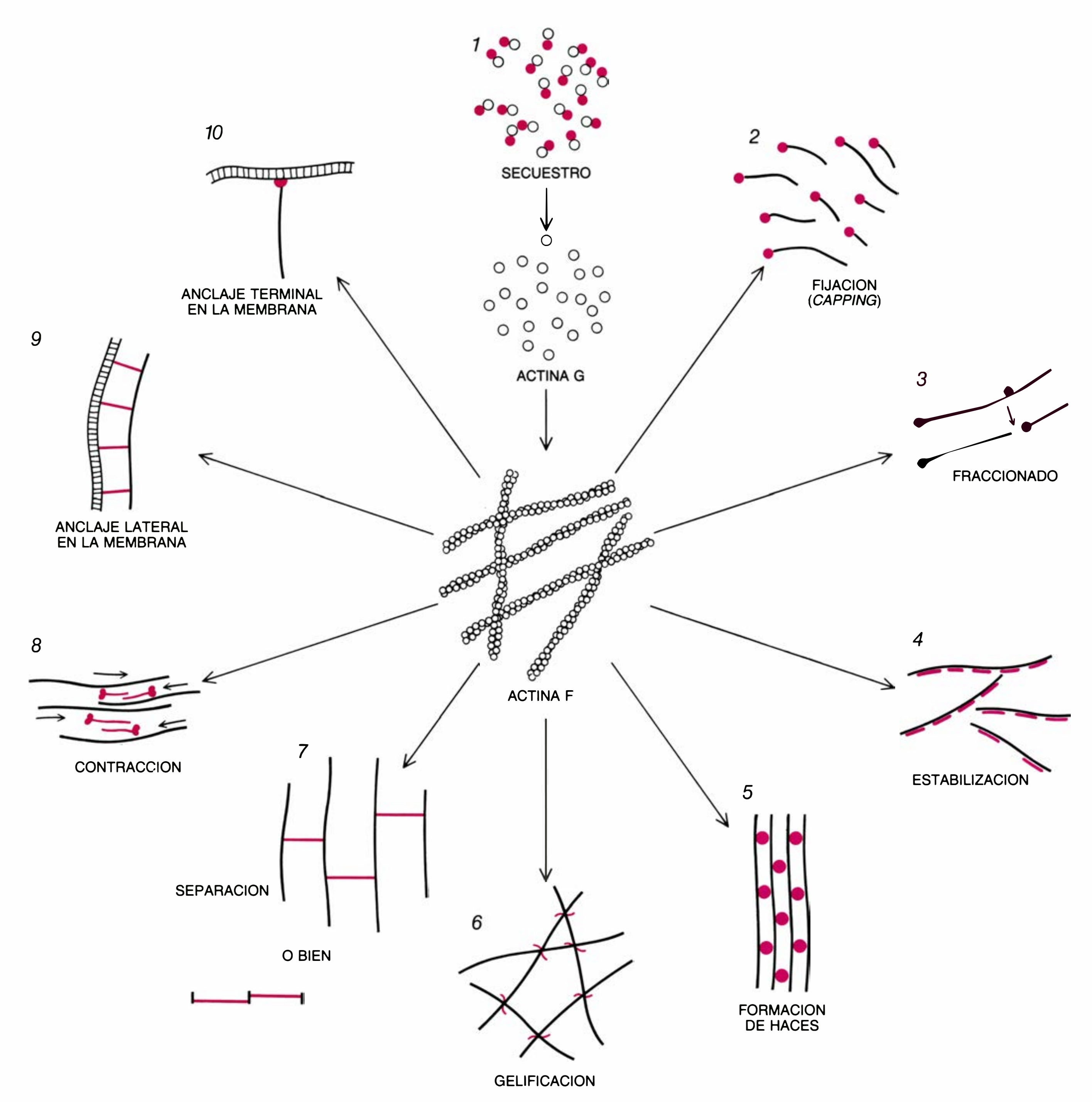
Las micrografías electrónicas han mostrado otros tipos de interacción entre microfilamentos y membranas de la superficie celular. Muchas de estas interacciones encierran, sin duda, un significado estructural, como es el caso de los glóbulos rojos de la sangre y del epitelio intestinal; los detalles moleculares de la interacción se conocen peor en otras células.

Resulta también verosímil que la red de microfilamentos debajo de la membrana plasmática desempeñe un papel importante en la fisiología celular. En el glóbulo rojo, la proteína transmembranar, denominada banda III en virtud de su posición en los geles electroforéticos, sirve de anclaje para ciertas enzimas glucolíticas, que intervienen en la degradación de la glucosa. La banda III actúa asimismo de canal que permite el intercambio iónico a través de la membrana, capacitando a los glóbulos rojos para liberar dióxido de carbono cuando atraviesan el tejido pulmonar, donde adquieren oxígeno. En otros tipos de células están presentes ciertas proteínquinasas (sustancias que cumplen una misión reguladora en la fisiología de la célula) en la red subyacente a la superficie. Además, las señales recibidas por receptores de la superficie externa de la membrana que se unen a moléculas mensajeras pueden incidir directamente en esta red subsuperficial.

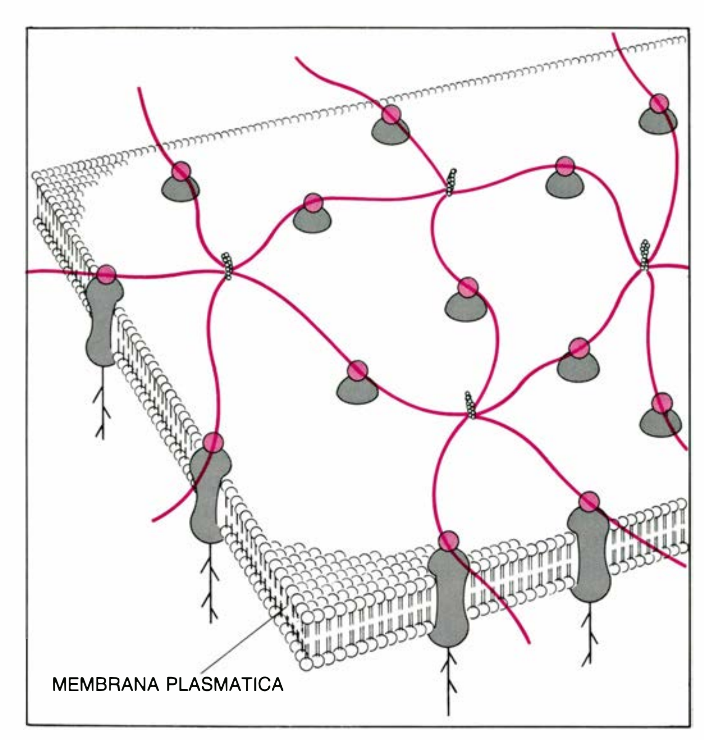
Ciertos virus tumorales pueden actuar también en la malla subyacente bajo la superficie. En células transformadas, proteínas codificadas por los oncogenes (genes inductores de cán-

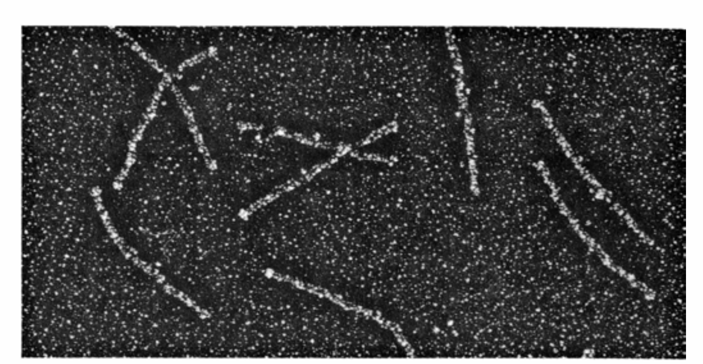
cer) de los virus pueden encontrarse dentro de la malla. Estas proteínas pueden ocasionar cambios drásticos en el citoesqueleto; en algunos casos se ha visto que actúan fosforilando proteínas específicas del citoesqueleto, es decir, añadiendo un grupo fosfato a las mismas.

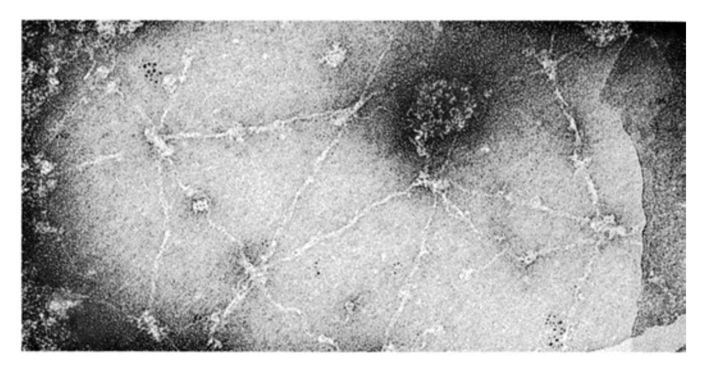
El segundo sistema de filamentos, los microtúbulos, difiere de los microfilamentos en su organización general, tal como muestran las imágenes de inmunofluorescencia. Desarrollan, además, un conjunto de funciones distintas. Aparecen como un factor importante de la organización y transporte intracelulares, así como de la arquitectura del conjunto celular. Sin embargo, los microtúbulos se parecen a los microfilamentos en que tienen una única proteína estructural importante. Una sustancia denominada tubulina es la base de los microtúbulos y también de orgánulos relacionados, como son los



5. PROTEINAS QUE SE UNEN A LA ACTINA. Aquéllas (*color*) gobiernan la organización y actividad de ésta (*negro*). La actina es la proteína básica de los microfilamentos. La actina globular (actina G), la subunidad proteica de los microfilamentos, se mantiene almacenada mediante la profilina, una proteína que actúa como factor secuestrante (*1*). A medida que se libera, la actina G va polimerizándose para crear hebras helicoidales: la actina filamentosa (actina F). Las hebras de actina F presentan polaridad; vale decir: tienden a añadir moléculas de actina G en un extremo y a desprenderlas en el otro. Los factores de fijación (*2*), uniéndose a uno u otro de los extremos de la hebra, regulan el proceso. Los factores de fraccionamiento (*3*) cortan hebras enteras; los factores de estabilización (*4*) contrarrestan los factores de fraccionamiento, uniéndose en paralelo a las hebras de actina y protegiéndolas de esta manera. Los factores formadores de haces (*5*), de gelificación (*6*) y de separación (*7*) dictan la organización espacial de los filamentos de actina; el factor de contracción, la miosina (*8*), hace que la organización sea dinámica. Se une a los filamentos de actina con polaridad opuesta (*flechas*) deslizándose uno al lado del otro. El proceso requiere trifosfato de adenosina (ATP), sustancia rica en energía. Además, otras proteínas (*9, 10*) anclan la red en la membrana de la superficie celular.







6. RED DE ACTINA Y ESPECTRINA en la superficie interna de la membrana de un glóbulo rojo humano; confiere a la célula resistencia y flexibilidad. Cadenas muy cortas de actina (*en negro en el dibujo de la izquierda*) forman los "nudos" de la red; las moléculas largas y delgadas del factor de separación espectrina (*en color*) interconectan la actina. La espectrina se une a una proteína conocida como anquirina (*en color negro*), que sujeta la red a una proteína denominada banda III (*en gris*) que está incluida en la membrana y sobresale de la superficie externa. Otros componentes proteicos (no mostrados aquí) estabilizan y refuerzan aún más la estructura subsuperficial. Una electromicrografía de una proteína purificada del tipo de la espectrina (*arriba a la derecha*), realizada por John Glenney durante una etapa de colaboración con los autores, muestra su forma alargada. Una micrografía de la membrana de un glóbulo rojo (*abajo a la derecha*) que se estiró unas 10 veces respecto de su tamaño real para exponer su organización, revela los enlaces de espectrina, los puntos de enlace con la anquirina en las uniones y las cadenas de actina. Esta micrografía nos la ha cedido Timothy J. Byers y Daniel Branton, de la Universidad de Harvard.

cilios y los flagelos (dos tipos de apéndices con los que ciertas células se autopropulsan o mueven líquido circundante o partículas), los cuerpos basales, a los que se unen cilios y flagelos, y los centriolos.

Al igual que la actina de los microfilamentos, la tubulina forma polímeros. La tubulina es, en sí, una proteína globular que consta de dos polipéptidos distintos aunque similares, la alfa tubulina y la beta tubulina. La polimerización de la tubulina puede observarse in vitro. En presencia de trifosfato de guanosina (GTP), un compuesto portador de energía similar al ATP, los dímeros de tubulina (las moléculas dobles formadas por alfa y beta tubulina) se unen y forman un tubo cuya parte central se mantiene vacía. (Es de destacar que, después de unos 20 años de haberse observado los microtúbulos bajo el microscopio electrónico, seguimos sin saber si el espacio central, de unos 10 nanómetros de diámetro, desempeña alguna función.)

Los estudios microscópicos y bioquímicos sugieren que los microtúbulos, como los microfilamentos, están asociados a otras proteínas que influyen sobre su organización y actividad. La microscopía electrónica demuestra que cierto número de proteínas asociadas se proyectan desde la pared de los microtúbulos hacia el citoplasma, a veces decenas de nanómetros; su función puede ser la de unir los microtúbulos a otros componentes citoplasmáticos o delimitar una zona protegida alrededor de cada microtúbulo.

Las propiedades bioquímicas de la tubulina apuntan hacia la existencia de otras proteínas asociadas. Al igual que la actina F, los microtúbulos manifiestan una polaridad in vitro: un extremo tiende a extenderse por polimerización, mientras que el otro tiende a acortarse, dando lugar a un proceso de cinta transportadora similar al demostrado para la actina F. Así, ciertas proteínas o sustancias más complejas actuarían de factores de fijación, ejerciendo efectos pronunciados sobre la formación y degradación de los microtúbulos. In vitro, los centrosomas parecen dominar ("nucleate") el conjunto de microtúbulos que se expande y retrae. Su inestabilidad dinámica podría explicar ciertos aspectos del comportamiento in vivo del microtúbulo, de manera especial en el huso mitótico. Reviste indudable interés anotar que los extremos del microtúbulo que contenían GTP (la forma rica en energía) parecían más resistentes al acortamiento por despolimerización que los extremos con una proporción más alta de GDP.

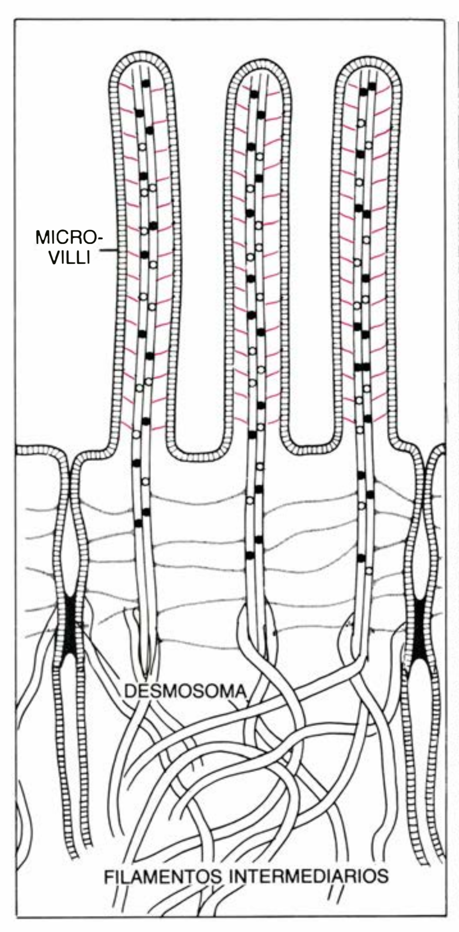
Algunas proteínas asociadas a la tubulina quizás hagan acto de presencia sólo durante fases específicas de la existencia de la célula o en compartimentos concretos de la misma, lo que sugiere que podrían desarrollar funciones únicas. Contamos con datos de especial seducción; verbigracia: proteínas asociadas que son exclusivas de la tubulina del huso mitótico. En el rango de las neuronas parecen darse distintas proteínas asociadas a los microtúbulos en las dendritas y en los axones. En los cilios y flagelos la tubulina se une a una proteína flexible denominada dineína. Al igual que la miosina, la dineína es una ATPasa, y suministra la energía para el latigueo de cilios y flagelos.

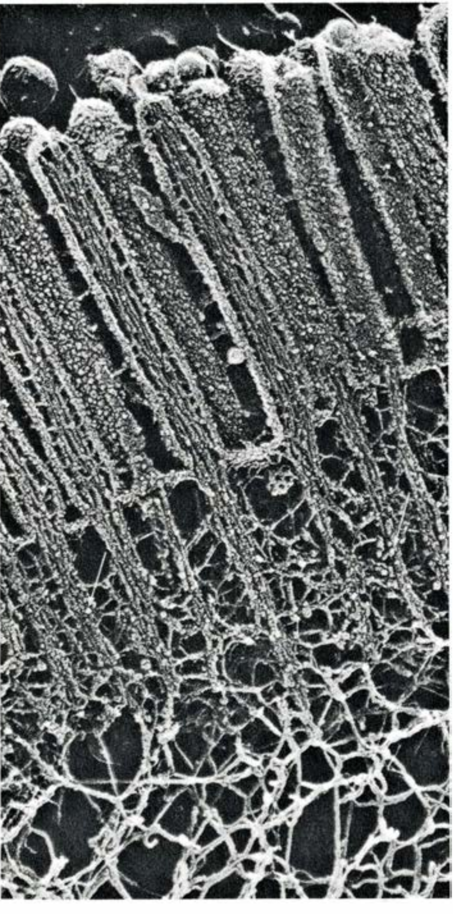
Resulta verosímil que la dineína o alguna otra análoga a la miosina dependiente de ATP se una también a la tubulina en el citoplasma. Si ello ocurre, un sistema citoplasmático de tubulina y dineína podría proporcionar una base adicional para el movimiento celular. La tubulina podría también conferir soporte a cierto movimiento mediante

factores de fijación y el acortamiento o alargamiento de los microtúbulos.

Un mecanismo diferente, basado en la tubulina y una presunta proteína asociada a ella, puede transportar vesículas a lo largo de los axones de las células nerviosas y mover quizás otros orgánulos dentro del citoplasma. Un reciente estudio in vitro demostró que las vesículas aisladas de los axones gigantes del calamar se desplazaban a lo largo de microtúbulos purificados a velocidades de hasta un micrometro por segundo cuando se añadía ATP y una mezcla cruda de proteínas celulares. Se cree que alguna proteína de la mezcla, hasta ahora no identificada, actuaba de transportador, probablemente uniéndose tanto a las vesículas como a un microtúbulo. El transportador hipotético desempeñaría funciones de ATPasa, rompiendo ATP para conseguir la energía que necesita el transporte de las vesículas.

Permanecen oscuros los pormenores de la dinámica microtubular en el citoplasma; son evidentes sus papeles estructurales. Las polaridades de todos los microtúbulos que irradian del centrosoma son probablemente idénticas. Si una célula se trata con el fármaco colcemid (nombre comercial de la colchicina), sus microtúbulos se despolimerizan y acaban por desaparecer. Cuando el fármaco se elimina por lavado, los microtúbulos reaparecen de una forma unidireccional, alargándose centrífugamente del centrosoma a la velocidad de un micrometro aproximado por minuto (a una temperatura de 37 grados Celsius), que es más o menos la misma velocidad que se observa cuando la tubulina polimeriza in vitro.





7. ANDAMIO DE ACTINA. Presta rigidez a los microvilli (proyecciones digitiformes) de la superficie de una célula epitelial intestinal. Dentro de cada microvillus los factores formadores de haces, villina (*las circunferencias del dibujo de la izquierda*) y fimbrina (*puntos negros*) unen filamentos de actina (*en negro*) según un haz longitudinal. Otra proteína (*en color*) tiende puentes laterales entre el haz y la membrana de la superficie del microvillus. No se sabe cómo está anclado el haz en su extremo superior. Por debajo de los microvilli, una variante del factor de separación espectrina (*en gris*) forma una malla en la que se enraízan los haces. En un plano más profundo, las fibras de actina se entremezclan con los filamentos intermediarios de la célula, formados por queratina. A su vez, los filamentos de queratina están anclados en regiones especializadas de la membrana celular, en los desmosomas, que cementan células epiteliales entre sí. Una micrografía de criosublimación profunda (*derecha*) de una célula intestinal, tratada con detergente para extraer las proteínas solubles, muestra unos cuantos microvilli. En varios se aprecian los haces de actina y sus conexiones con la membrana, así como redes de espectrina y queratina. (Micrografía de J. E. Heusen.)

A los 75 minutos torna a observarse una estructura microtubular similar a la que ofrece una célula normal. La naturaleza direccional de los microtúbulos nos sugiere que podrían actuar como guías para el transporte radial dirigido dentro de la célula.

Por lo que se ve, los microtúbulos intervienen también en la conformación y orientación distintivas de ciertas células. Un fibroblasto (célula del tejido conjuntivo), por ejemplo, es asimétrico; presenta un borde de avance fruncido y una cola esbelta al desplazarse por un substrato. Cuando se trata una célula de este tipo con colcemid, provocando la desaparición de los microtúbulos, adquiere mayor simetría y su locomoción se detiene.

Se hace patente que este tratamiento altera las funciones de la célula. El movimiento característico de los orgánulos intracelulares y de ciertas vesículas –movimientos intermitentes y dirigidos– se detiene. Las membranas del aparato de Golgi se desordenan y se apartan de su localización normal cerca del centrosoma y el sistema de canales interconectados que constituye el retículo endoplasmático parece retraerse. La alteración de los microtúbulos en células no epiteliales influye, según parece, en otro sistema de fibras, los filamentos intermediarios: se retraen hacia el interior de la célula y se arrollan alrededor del núcleo.

Los experimentos con otros fármacos que alteran la disposición normal de los microtúbulos han aportado más pruebas de que éstos definen un orden espacial dentro de la célula. El taxol, un fármaco que promueve la polimerización de la tubulina, provoca que los microtúbulos de una célula formen haces que ya no conectan con el centrosoma; efectos similares se obtienen cuando se inyectan en la célula anticuerpos específicos de la tubulina.

Los microtúbulos parecen establecer, pues, la geometría de la célula, actuando como pistas que orientan otros fenómenos celulares. En células de dimensiones limitadas, esta guía quiza no sea necesaria, por lo menos para el transporte intracelular: los caprichos del movimiento browniano pueden bastar para enviar vesículas y otros orgánulos a sus lugares correspondientes del interior celular. En células de la asimetría de las neuronas, cuyos axones se extienden varios metros en algunos animales, la guía puede, sin embargo, resultar esencial para el transporte dentro de la célula.

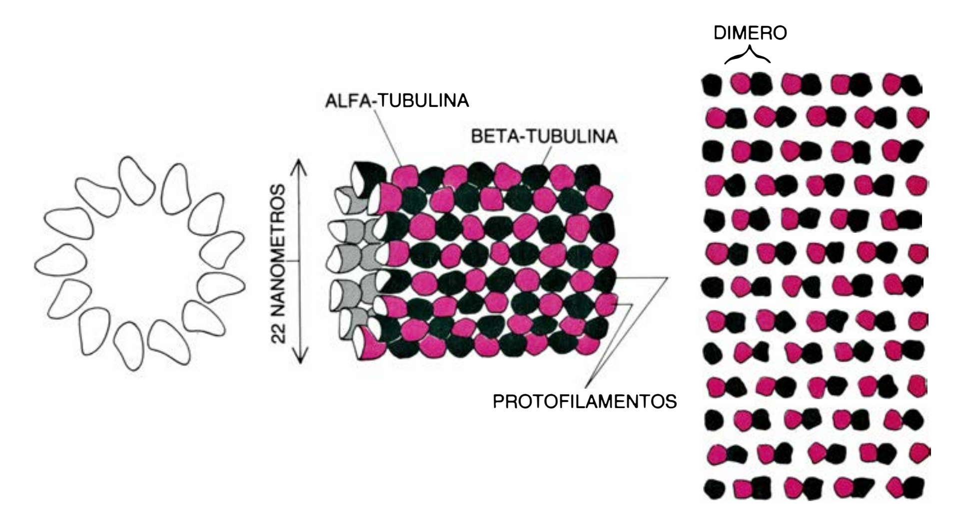
Sabemos menos de la función de los

filamentos intermediarios, el tercer elemento del citoesqueleto. Es también más difícil generalizar acerca de su bioquímica. Las proteínas básicas de los filamentos intermediarios están codificadas por una única familia de genes; ahora bien, diferentes genes de la familia se expresan en diferentes tipos de células y tejidos. Hacia finales de los años setenta, los estudios inmunológicos y bioquímicos demostraron que los genes para las proteínas de los filamentos intermediarios se expresaban de acuerdo con la vía que seguía el tejido durante la embriogénesis.

La diversidad de vías da lugar a cinco tipos de filamentos intermediarios, bioquímicamente distintos: queratinas epiteliales en células epiteliales, neurofilamentos en la mayoría de neuronas (aunque probablemente no en todas), filamentos de desmina en el músculo, filamentos gliales en las células del mismo nombre (las células de soporte del cerebro, médula espinal y sistema nervioso periférico) y filamentos de vimentina en células de origen mesenquimatoso, como las del tejido conjuntivo y en los vasos sanguíneos y linfáticos. Existen subtipos dentro de las queratinas epiteliales; se han catalogado unas 20 moléculas distintas en el tejido humano, algunas específicas de epitelios morfológicamente diversos.

Las moléculas de las proteínas de los filamentos intermediarios poseen todas una región central en forma de varilla de longitud invariable. Dentro de esta región, las proteínas son muy similares: entre el 30 y el 70 por ciento de los aminoácidos integrantes son idénticos. La región en forma de varilla constituye la base estructural del conjunto del filamento intermediario. Una sección transversal de un único filamento de 10 nanómetros mostraría unas 30 moléculas dispuestas de forma entrelazada. A diferencia de lo que ocurre con la polimerización de los microfilamentos y microtúbulos a partir de subunidades globulares, la construcción de los filamentos intermediarios no requiere ATP ni GTP.

Las regiones terminales de las proteínas de los filamentos intermediarios son mucho más variables en tamaño y en contenido de aminoácidos que las varillas centrales. En general, las regiones terminales no participan en la unión de moléculas para formar un filamento. Probablemente se extienden desde el filamento hacia el citoplasma, donde intervendrían en la unión entre el filamento y otros componentes estructurales. Por ejemplo, un extremo de la proteína mayor del neurofilamento explica los finos puentes transversales entre neurofilamentos axónicos vecinos, que se observan en las electromicrografías.



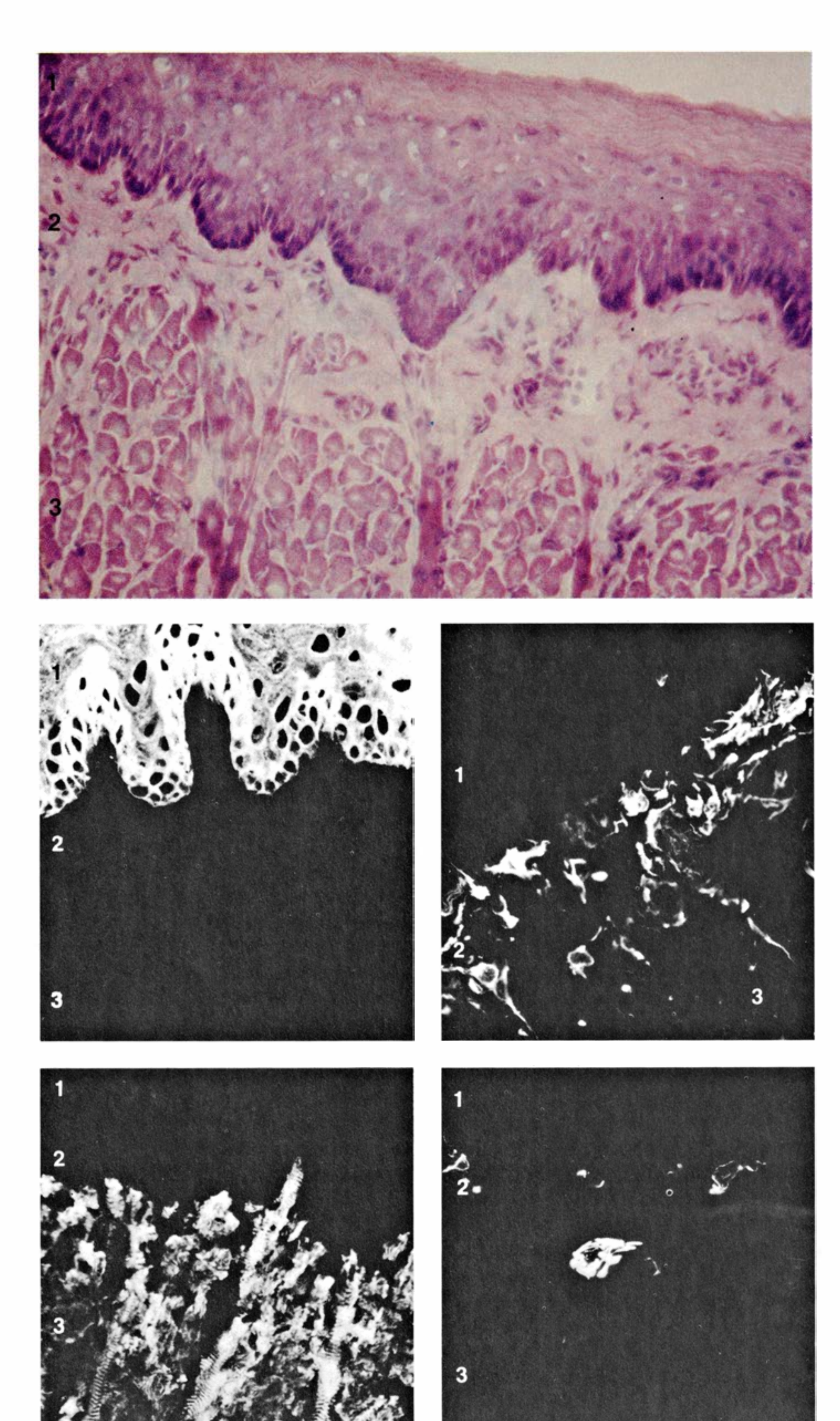
8. CONFORMACION DE LA TUBULINA, que tiene lugar al unirse dímeros de alfa y beta tubulina para constituir 13 protofilamentos que se disponen alrededor de una región vacía. El microtúbulo, de 22 nanómetros de diámetro, se ofrece visto por un extremo (*izquierda*), lateralmente (*centro*) y desarrollado.

Como los demás sistemas de filamentos, los intermediarios tienen asociadas un conjunto de proteínas, de las que se conocen sólo algunas. Su papel, y por tanto la función de toda la red, resulta bastante difícil de adivinar. Cuando se inyectan anticuerpos contra las proteínas de los filamentos intermediarios en células cultivadas, no parecen resultar afectadas ni la locomoción ni la división celular. Los filamentos intermediarios podrían desempeñar un papel sutil en la dinámica de la célula, difícil de descubrir en el laboratorio.

Se observa, sin embargo, que en algunas células y tejidos los filamentos intermediarios cumplen un propósito estructural. Se acepta ampliamente que los filamentos intermediarios están unidos por un extremo a la membrana que envuelve el núcleo, y se sabe que en las células epiteliales muchos de los filamentos de queratina están anclados en regiones especializadas de la membrana superficial celular, conocidos como desmosomas. Los desmosomas son un tipo de nudo intercelular que sirve para unir células vecinas. En el rango del desmosoma, las proteínas especializadas de cada célula se extienden a través de la membrana y proyectan un extremo de glucoproteína hacia la superficie externa; las glucoproteínas interactúan con otras similares de la otra mitad del desmosoma para así unir las células. Las fibras de queratina y los desmosomas integran conjuntamente el epitelio, confiriéndole estabilidad y resistencia. En algunas células no epiteliales, los filamentos intermediarios pueden unirse a la telaraña actina-espectrina situada debajo de la membrana.

Los tres sistemas de filamentos no son unidades de la arquitectura celular que se den por separado, sin ninguna relación de dependencia. La pareja disposición de microtúbulos y filamentos intermediarios, así como los efectos provocados sobre los filamentos intermediarios de células no epiteliales por la desorganización de los microtúbulos, pone de manifiesto la ligazón de ambos sistemas, quizás a través de proteínas asociadas. Parece asimismo verosímil que los microtúbulos sean el andamio sobre el que se erige la trama permanente de filamentos intermediarios. Las micrografías electrónicas sugieren también conexiones entre microfilamentos y filamentos intermediarios. La verdad es que la idea de que los tres sistemas de filamentos forman una trama integral, a la que pueden asociarse orgánulos y hasta enzimas y proteínas solubles, se halla lejos de gozar del favor unánime.

Algunos investigadores hablan de un cuarto sistema de fibras que integra los otros sistemas de filamentos. Este "retículo microtrabecular", cuya existencia estaba implícita en ciertas electromicrografías de alta aceleración, se considera una red irregular, de finas fibras, cuyo diámetro oscila entre menos de dos nanómetros y más de 10; todos los elementos fibrosos restantes de la célula, así como sus orgánulos, estarían incluidos en las microtrabéculas, que



9. LOS TIPOS CELULARES pueden distinguirse en los tejidos complejos por las proteínas de los filamentos intermediarios que contienen. Las micrografías muestran diversas secciones de la lengua susceptibles de comparación. Las cuatro imágenes inferiores se obtuvieron utilizando anticuerpos contra las diferentes proteínas de los filamentos intermediarios marcados con una sustancia fluorescente. La micrografía de la parte superior, presentada como punto de referencia, se tiñó por la técnica convencional de hematoxilina-eosina. Los números indican la misma capa de tejido en las distintas imágenes. El anticuerpo contra la queratina se une a las células epidérmicas de la capa 1 y las torna visibles (*centro, a la izquierda*); el anticuerpo contra la vimentina distingue las células del tejido conjuntivo de los vasos sanguíneos, concentrados en la capa 2 (*centro, a la derecha*); el anticuerpo contra la desmina pone de manifiesto las células musculares que construyen la capa 3 (*abajo, a la izquierda*), y el anticuerpo contra la proteína de los neurofilamentos resalta los axones y cuerpos celulares neuronales que se hallan distribuidos en este corte de la lengua (*abajo, a la derecha*).

vendrían a ser la sustancia celular de fondo. Presumiblemente, la constitución proteica de las microtrabéculas difería de la propia de los otros tres sistemas; resulta, empero, muy improbable la existencia de otra proteína celular principal, todavía por descubrir en los análisis bioquímicos del citoplasma.

Más que constituir un cuarto sistema, el retículo visto en las micrografías refleja, a buen seguro, las intrincadas interconexiones e interdigitaciones de los tres sistemas establecidos, así como cierto deshilachado artificial de las estructuras citoesqueléticas. Cabe, además, la posibilidad, de que durante la preparación de las muestras para microscopía electrónica de alto voltaje, las proteínas disueltas en el citoplasma se fijen sobre las formaciones filamentosas, aumentando su manifiesta complejidad. En este orden, las mejores técnicas de fijación acaban de lograr electromicrografías de alta aceleración en las que el sistema microtrabecular está punto menos que ausente.

Y si todavía no nos es dado describir la matriz celular como una estructura única, tampoco avanza con rapidez nuestro conocimiento general de su papel en la dinámica celular. Los microfilamentos son cruciales para la locomoción celular y el movimiento en superficie y los microtúbulos son cruciales para la mitosis, pero queda mucho por averiguar sobre la complejidad de sus funciones. El hecho es que, muchas veces, no se ve claro que la matriz sea necesaria para que se cumpla una función celular determinada o si sólo la favorece. Se puede sostener, por ejemplo, que el proceso fundamental de la locomoción celular sea la extensión del borde de avance de la célula mediante el aporte de membrana en ese nivel; la contracción de los microfilamentos, mediada por la miosina, serviría entonces de mecanismo de seguimiento necesario para arrastrar el resto de la célula detrás de la membrana de avance.

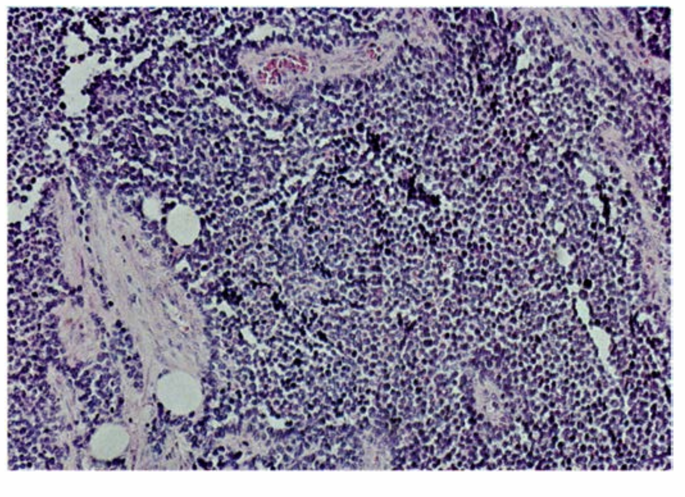
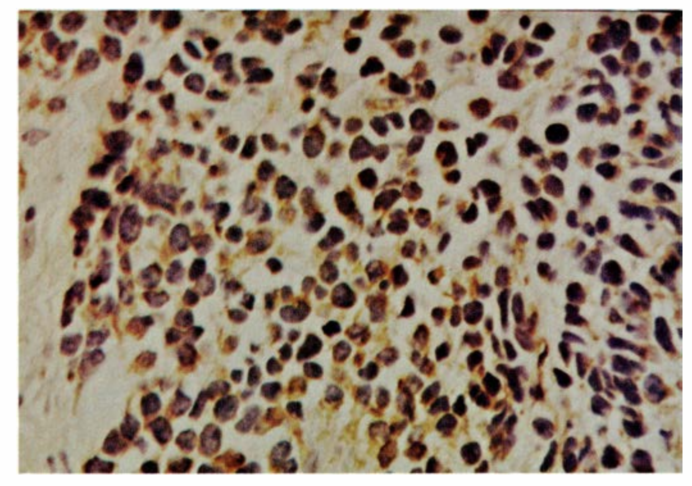
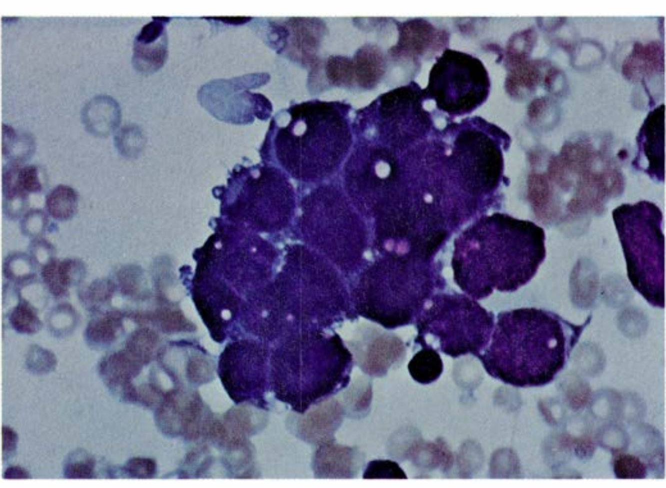
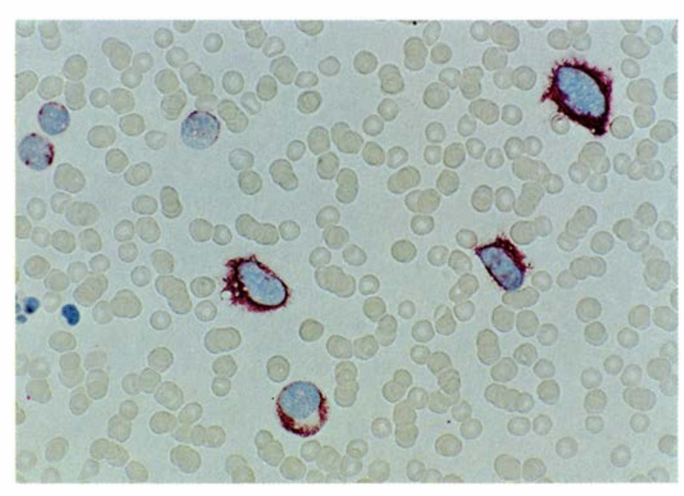
Las técnicas de la genética molecular habrán de ayudar a poner en claro la función de las proteínas del citoesqueleto. Se ha demostrado ya que ciertas mutaciones del gen que codifica la actina en la levadura alteran la síntesis, construcción e integridad de la membrana plasmática y el movimiento de las vesículas secretoras hacia la superficie celular. Este hallazgo implica que los microfilamentos intervienen en ambos procesos. La creación de mutaciones en loci especializados de los genes que controlan los elementos citoesqueléticos y la introducción en la célula de

ADN clonado que codifique proteínas citoesqueléticas alteradas deberían permitir observar los efectos no sólo de una única alteración en la matriz, sino también de múltiples cambios. Estas técnicas aclararían las interrelaciones estructurales y dinámicas entre las proteínas del citoesqueleto.

Queda mucho por conocer acerca de la matriz celular. Lo que se ha conseguido ya se ha podido utilizar en el diagnóstico e investigación de la patología humana. Ciertas proteínas de la matriz, y en particular las de los filamentos intermediarios, al variar de un tejido a otro, aportan una base en que apoyarse para distinguir entre tipos celulares. Poder clasificar correctamente las células es crucial para el diagnóstico de cánceres, que producen metástasis en lugares alejados del tejido de origen. El tratamiento apropiado puede depender del conocimiento del origen celular del tumor.

La tipificación de los filamentos intermediarios por microscopía de inmunofluorescencia permite reconocer los grupos tumorales principales. Así, las queratinas se encuentran en los carcinomas (tumores de origen epitelial), la proteína de los filamentos de la glía en los tumores cuyo origen es la glía, desmina en sarcomas de células musculares, vimentina en linfomas y sarcomas no musculares, y las proteínas de los neurofilamentos en tumores que se originan en el sistema nervioso simpático. En el caso de los carcinomas las múltiples formas variantes de la queratina hacen posible unas distinciones diagnósticas más precisas: por ejemplo, entre carcinomas de células escamosas y adenocarcinomas. El patólogo cuenta con esa técnica para caracterizar rápidamente y sin ambigüedades algunos tumores del segmento que comprende del 5 al 10 por ciento de los tumores de difícil diagnóstico cuando se utilizan los colorantes convencionales de la patología. Por tratarse de un método extremadamente sensible, ayuda también a detectar micrometástasis de algunas células tumorales en los nódulos linfáticos o en la médula ósea.

La tipificación de los filamentos intermediarios tiene otras aplicaciones médicas. Combinado con la amniocentesis, pone de manifiesto ciertas malformaciones congénitas. La presencia en el fluido amniótico de células que portan filamentos de glía o neurofilamentos, por ejemplo, puede ser indicadora de un feto con una malformación del sistema nervioso central. La técnica ha revelado asimismo anormalidades de los filamentos intermediarios en el músculo de pacientes aquejados de trastornos de la musculatura cardíaca y esquelética, en el hígado de los alcohólicos y posiblemente en el cerebro de los afectados por la enfermedad de Alzheimer. Estas aplicaciones ilustran hasta qué punto la investigación básica en biología celular contribuye al diagnóstico.

10. PROCEDENCIA DE CELULAS TUMORALES revelada por la tipificación de los filamentos intermediarios. Las ilustraciones de la izquierda muestran células de dos pacientes afectados de cáncer, según preparaciones teñidas por métodos habituales: el corte de un tumor obtenido por biopsia (*arriba*) y un frotis de médula ósea (*abajo*). Ninguna de las dos preparaciones permite dar un diagnóstico definitivo sobre el tipo de tumor. Especímenes similares se trataron con anticuerpo contra la desmina, proteína de los filamentos intermedarios, y luego con un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa de rábano, para el corte del tumor, y fosfatasa alcalina, por lo que se refiere al frotis. En ambas preparaciones, el estudio inmunológico tiñó intensamente el citoplasma de las células tumorales (*las células marrones, arriba a la derecha, y las células rojas, abajo a la derecha*). La desmina es la proteína de los filamentos intermediarios característica del músculo; su detección hizo posible identificar el tumor, en ambos casos, como un rabdomiosarcoma, variedad maligna que se origina en el músculo esquelético. Las imágenes de la parte superior se obtuvieron en el laboratorio del autor; pertenen las situadas debajo a David Mason, de Oxford.

Moléculas del sistema inmunitario

Las proteínas que reconocen invasores foráneos son los polipéptidos más diversos de que se tiene noticia. Codificadas por centenares de fragmentos de genes, se combinan en miles de millones de variedades distintas

Susumu Tonegawa

El sistema inmunitario constituye un elemento esencial para la superviviencia; sin él, la muerte por infección resulta inevitable. Dejando de lado su función vital, el sistema inmunitario constituye también un ejemplo fascinante del ingenio biológico. Las células y moléculas de esa red defensiva se mantienen en continua vigilancia ante los organismos infecciosos. Reconocen una variedad casi ilimitada de células y sustancias foráneas, distinguiéndolas de las del propio cuerpo. Cuando un agente patógeno penetra en el cuerpo, lo detectan y se movilizan para eliminarlo. "Recuerdan" cada una de las infecciones, de modo que cualquier reincidencia de un mismo organismo reciba un trato más eficaz. Es más, todo ello lo realizan a costa de un exiguo presupuesto de defensa, en el que participa tan sólo una pequeña parte del genoma y de los recursos del cuerpo.

El punto fundamental del montaje de una respuesta inmunitaria es el reconocimiento de marcadores químicos que distingan lo propio de lo que no lo es. Las moléculas a las que se ha confiado esa tarea son proteínas cuya propiedad más sorprendente es la variabilidad de su estructura. En general, todas las moléculas de una determinada proteína que elabore un individuo son absolutamente idénticas: tienen la misma secuencia de aminoácidos. En todo caso, pueden darse dos versiones de una proteína, especificadas por los genes paternos y maternos. Las proteínas de reconocimiento del sistema inmunitario, por el contrario, se presentan bajo millones, y tal vez miles de millones, de formas ligeramente diferentes. Esas diferencias permiten a cada molécula reconocer un modelo específico de diana o efector.

Las proteínas de reconocimiento que nos resultan más familiares son los anticuerpos, o inmunoglobulinas. Mucho se sabe ya de su estructura y, lo que no es menos importante, de los mecanismos genéticos responsables de su diversidad. Se ha comprobado que ese gran número de anticuerpos se produce por la entremezcla de un número muy inferior de fragmentos génicos, hecho que constituye un espectacular ejemplo de que el ADN no es un archivo inerte, sino que puede alterarse a lo largo de la vida de un individuo. En el transcurso de la síntesis de anticuerpos, la fragmentación y reunión de las secuencias de genes no constituyen una mera característica incidental del proceso genético, sino que resultan esenciales para el funcionamiento del sistema inmunitario.

Otra clase de moléculas de reconocimiento son las proteínas denominadas receptores de las células *T*. Dada la dificultad que entraña su aislamiento, sus propiedades se conocen peor que las de los anticuerpos. No cabe duda de su parentesco con las inmunoglobulinas en lo concerniente a su estructura y origen evolutivo; su misma diversidad se basa también en un mecanismo genético similar, pero su modo de operar es sutilmente distinto. Un receptor de células *T* reconoce sólo aquellas células que llevan a la vez marcadores propios y no propios. Por ese curioso método, las células *T* pueden actuar directamente contra infecciones víricas y regular otros componentes del sistema inmunitario.

Las células fundamentales del sistema inmunitario son los pequeños glóbulos blancos de la sangre, los linfocitos. Al igual que otras células sanguíneas, proceden de células madre de la médula ósea. En los mamíferos, una de las clases de linfocitos, las células *B*, completan su maduración en la médula ósea. Otra, las células *T*, sufre una posterior diferenciación en la glándula del timo. El tamaño y aspecto de ambas clases son iguales, pero participan en formas diferentes de la respuesta inmunitaria.

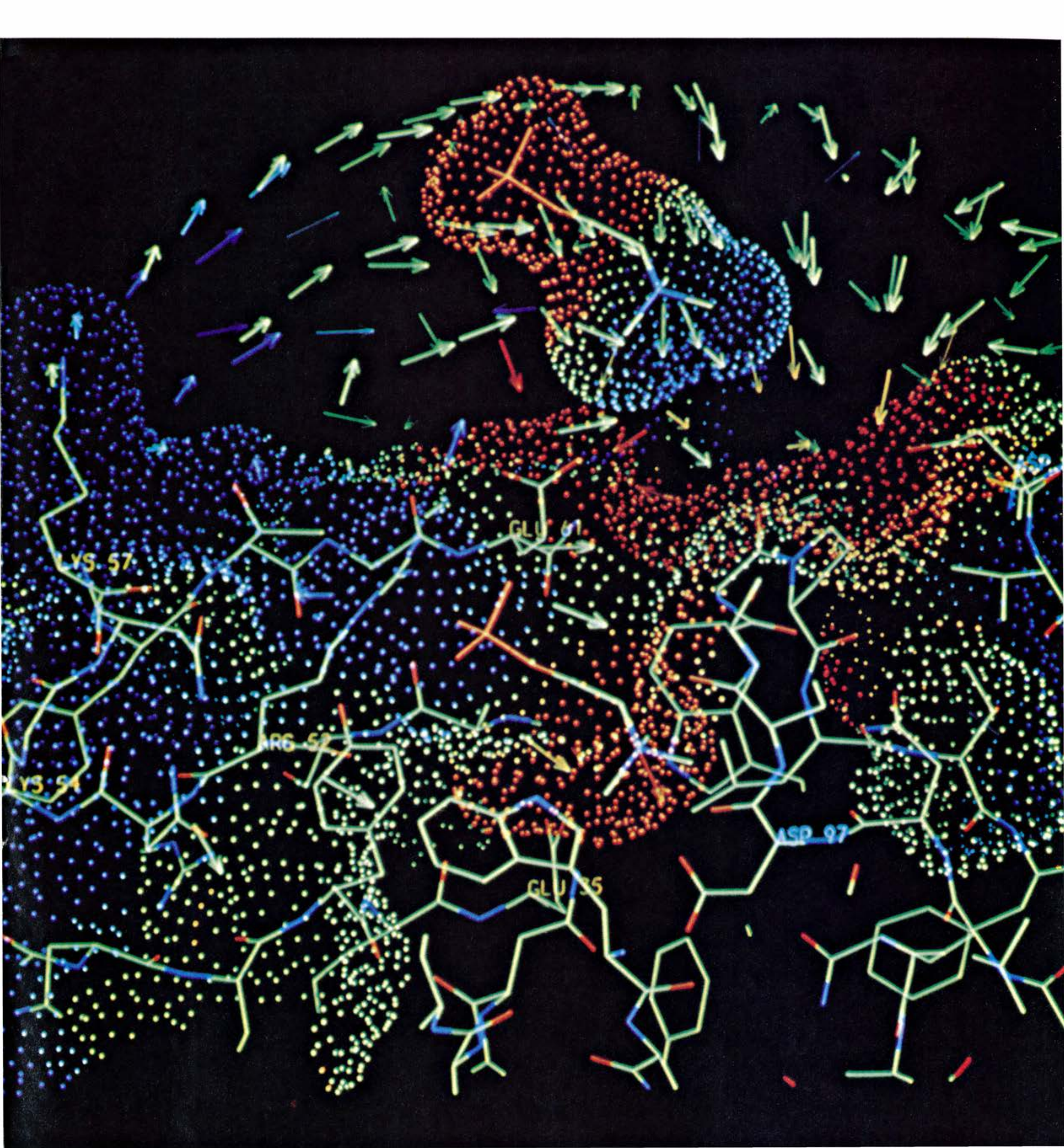
Los linfocitos *B* son las células que fabrican anticuerpos. Su modo de acción fundamental se recoge en la teoría de la selección clonal propuesta hace 30 años por Sir Macfarlane Burnet. A medida que las células *B* maduran en la médula ósea, quedan comprometidas en la síntesis de anticuerpos que reconocen un antígeno, o modelo molecular, específico. En el más simple de los

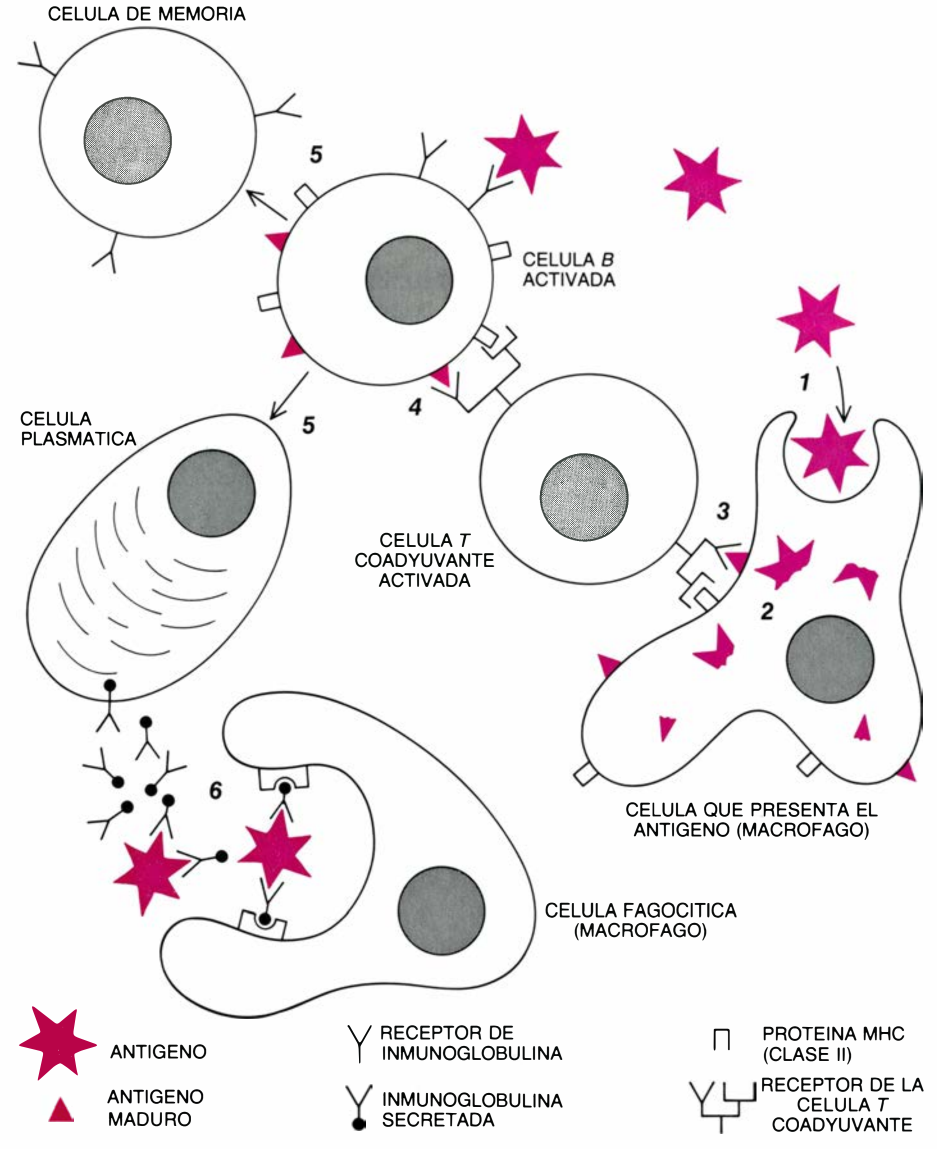
1. UNION DEL ANTIGENO al anticuerpo, acontecimiento fundamental del reconocimiento de un organismo foráneo que ha penetrado en el cuerpo. En la imagen generada por ordenador de la página opuesta la sustancia que se ha unido no es en realidad un antígeno, sino un hapteno, una pequeña molécula con afinidad por un anticuerpo determinado. El hapteno que se muestra aquí es la fosfocolina. Lo guían hacia el sitio de unión del antígeno interacciones electrostáticas, hasta que encaja en una hendidura de la superficie del anticuerpo. Su orientación al aproximarse al sitio de unión, según se muestra en la parte central superior de la imagen, se deduce de los cálculos realizados por Elizabeth D. Getzoff, John A. Tainer y Arthur J. Olson, del Instituto de Investigación de la Clínica Scripps; el cálculo se basa en la estructura atómica del complejo anticuerpo-hapteno, determinada por Eduardo A. Padlan, Gerson H. Cohen y David R. Davies, de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos. El esqueleto de la proteína, así como el de la molécula de hapteno que se acerca, se muestran envueltos por puntos que corresponden a las superficies accesibles a moléculas de agua. Otro hapteno instalado en el sitio de unión antígeno-anticuerpo, justo debajo del primer hapteno, aparece sólo en forma de esqueleto. Los colores de los puntos indican el potencial electrostático calculado en varias regiones de la superficie molecular: el azul es el más positivo y, el rojo, el más negativo. Las flechas indican la dirección del campo electrostático y, sus colores, el potencial electrostático en los puntos de origen. La imagen se obtuvo con los programas GRAMPS, desarrollado por Olson y T. J. O'Donnell, de los Laboratorios Abbott, y GRANNY, escrito por Olson y Michael L. Connolly, de la Clínica Scripps.

casos, todos los descendientes de cada una de esas células conservan la misma especificidad, formándose un clon de células inmunológicamente idénticas. (En realidad, se introducen algunas variaciones a medida que las células proliferan.)

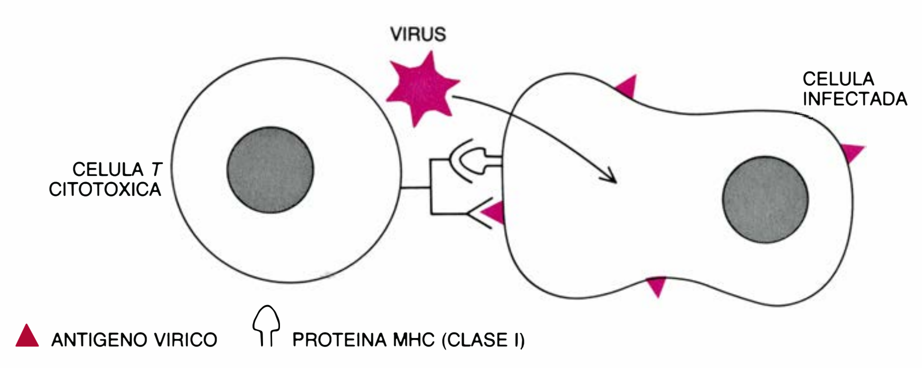
Los anticuerpos fabricados por una célula *B* permanecen unidos a la membrana de la célula, donde se presentan sobre la superficie a modo de moléculas receptoras. Cuando un antígeno se fija a un anticuerpo de la membrana, estimula la proliferación de la célula; ése es el proceso de selección clonal. En general, a una misma infección responden muchos clones. Los marcadores antigénicos reconocidos por los anticuerpos son modelos de estructura molecular relativamente pequeños; todo virus o bacteria es portador de gran número de modelos susceptibles de reconocimiento.

Parte de la descendencia de los clones seleccionados permanece en forma de linfocitos *B* circulantes. Actúan de memoria del sistema inmunitario, facilitando una respuesta más rápida ante una ulterior exposición a los mismos antígenos. Las células de memoria son las responsables de la inmunidad que se adquiere al paso de muchas infecciones, o instada por la vacunación. Otros miembros de los clones de células *B* seleccionados sufren una "diferenciación terminal": aumentan de tamaño, dejan





2. RESPUESTA INMUNITARIA A LA INFECCION, que moviliza a varias poblaciones de células que cooperan en ella. Las células *B*, o linfocitos *B*, portan inmunoglobulinas a modo de receptores de superficie, que reconocen y se unen a los antígenos circulantes; en general, sin embargo, a las células *B* no las activa sólo ese proceso de reconocimiento. En primer lugar, el antígeno debe recogerlo una célula que lo presente (*1*); un macrófago vale para ello. El macrófago degrada el antígeno (*2*) y lo exhibe sobre su superficie, donde lo reconoce una célula *T* coadyuvante (*helper*) que queda así activada (*3*). Seguidamente, la célula *T* coadyuvante activa células *B* portadoras del mismo antígeno elaborado (*4*). Las células *B* activadas proliferan y sufren una diferenciación terminal (*5*). Parte de la descendencia se convierte en células de memoria, que proporcionan una respuesta más rápida ante ulteriores infecciones, en tanto que otras células se desarrollan en células plasmáticas, secretoras de anticuerpos. Los anticuerpos secretados se unen al antígeno, marcándolo para su destrucción por parte de varios componentes del sistema inmunitario, macrófagos incluidos.



3. RECURRE LA RESPUESTA A LA INFECCION VIRICA a otros elementos del sistema inmunitario. Cuando un virus penetra en una célula las proteínas que constituyen su cubierta quedan englobadas en la membrana celular. Las células *T* citotóxicas reconocen específicamente esas moléculas, que se exhiben en combinación con proteínas que identifican al hospedador: las proteínas de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La célula infectada sufre un ataque mortal por parte de las células *T* citotóxicas.

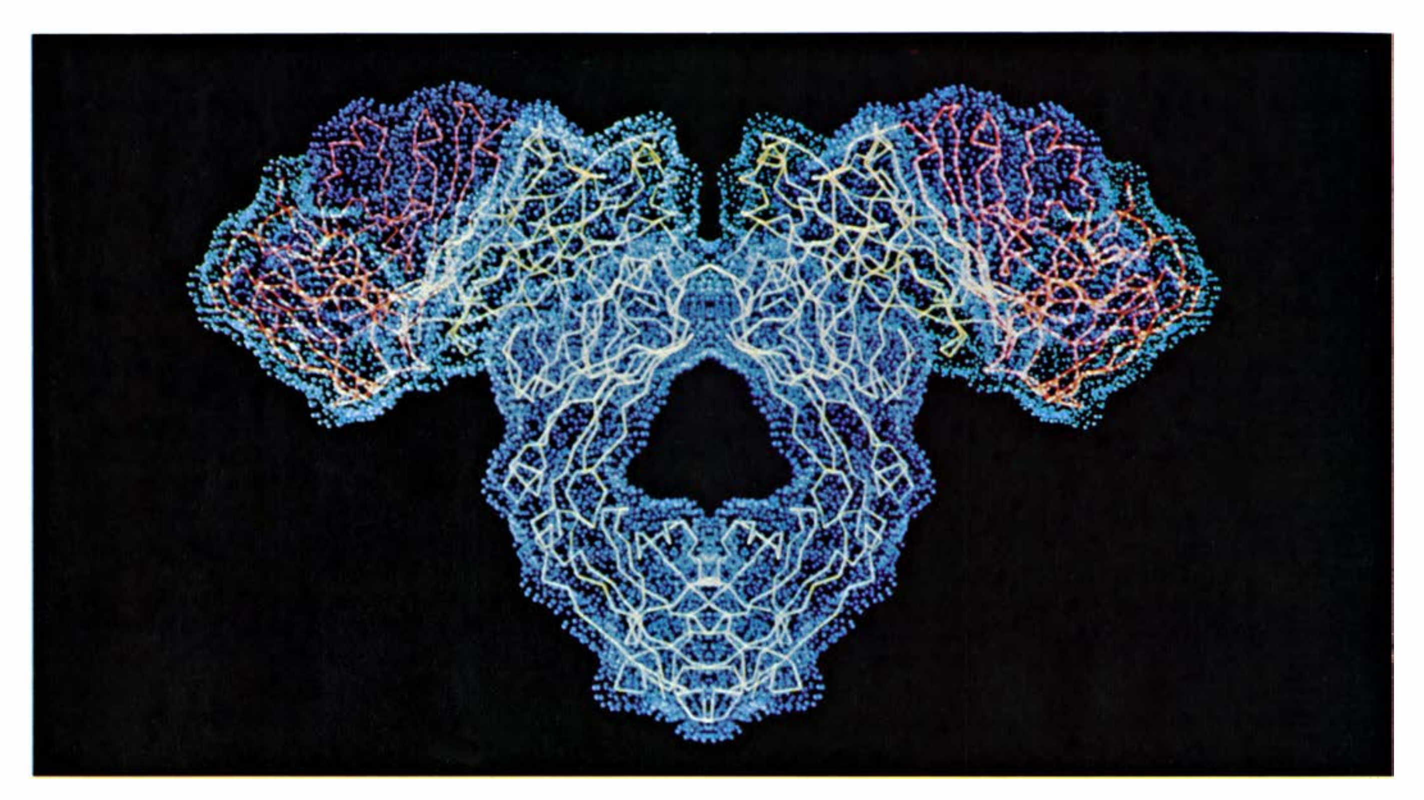
de reproducirse y dedican todos sus recursos a la producción de anticuerpos. En ese estadio se les denomina células plasmáticas y, aunque sólo viven unos pocos días más, segregan grandes cantidades de inmunoglobulinas.

Las moléculas del anticuerpo no destruyen directamente el organismo foráneo; lo marcan para que se deshagan de él otros sistemas defensivos. Uno de ellos es el sistema del complemento, un conjunto de más de una docena de proteínas que se activan sucesivamente sobre la superficie de la célula que lleve complejos antígeno-anticuerpo. El efecto de las proteínas del complemento es, en última instancia, la perforación de la membrana celular. Los complejos antígeno-anticuerpo también atraen a los macrófagos, que engloban y destruyen las partículas foráneas. Igualmente toman parte en la respuesta inmunitaria gran número de otras células.

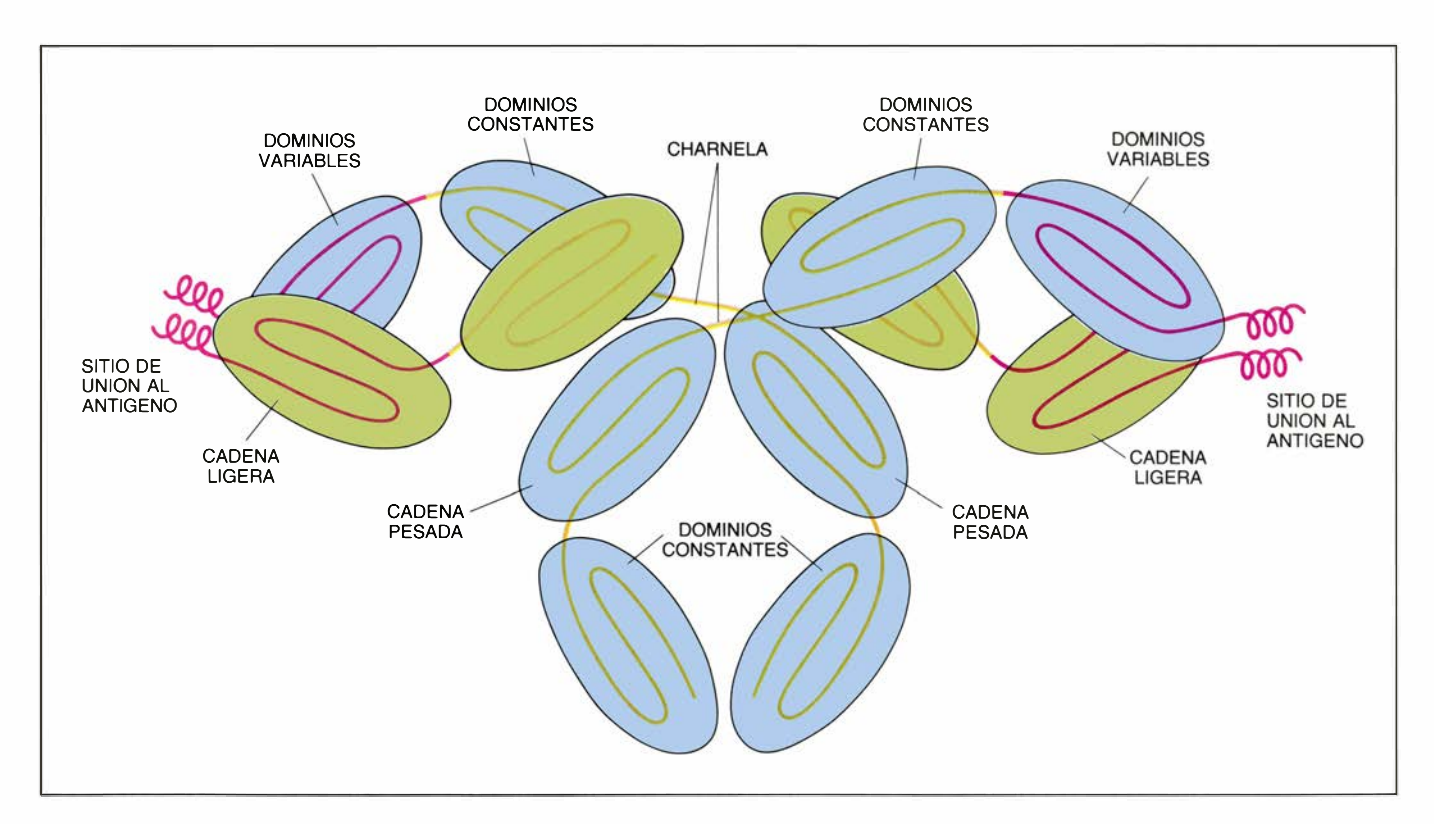
¿Cómo reconocen a los antígenos las moléculas de anticuerpo? La respuesta se halló analizando la secuencia de aminoácidos y la estructura tridimensional de los anticuerpos.

Una molécula básica de anticuerpo consta de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas ligeras idénticas, de unos 320 aminoácidos, y dos cadenas pesadas idénticas, de 330, o bien 440, aminoácidos. Las cuatro cadenas se mantienen unidas entre sí por puentes disulfuro y por enlaces covalentes, formando una estructura en forma de Y. Tanto la cadena pesada como la ligera se elaboran a partir de un dominio común, o subunidad subestructural, de unos 110 aminoácidos. Se diría que el gen que codificaba cierta proteína prototípica de tamaño similar se duplicó repetidamente y se alteró dando origen a los genes de ambas cadenas de la inmunoglobulina. Se elaboran dos copias algo distintas del dominio de la cadena ligera y tres, o cuatro, del de la cadena pesada. Todas las copias se repliegan en estructuras tridimensionales bastante similares.

Tanto en las cadenas pesadas como en las ligeras, el dominio del extremo amínico del polipéptido (el primero que se sintetiza) difiere de forma importante de los demás. En el dominio amino terminal se encuentra la mayor variación entre las secuencias de aminoácidos. En el anticuerpo plegado, las regiones variables constituyen la mitad terminal de los brazos de la Y: cada brazo contiene la región variable de una cadena pesada y la de una cadena ligera. Dentro de la región variable de



4. LA MOLECULA DE ANTICUERPO es una proteína en forma de Y constituida por cuatro cadenas polipeptídicas. Dos cadenas pesadas (*superficies azules*) se extienden desde el tallo de la Y a los brazos; otras dos ligeras (*superficies verdes*) están confinadas a los brazos. Cada polipéptido presenta regiones constantes (*esqueleto blanco y amarillo*) y regiones variables (*esqueleto rojo*). Todos los anticuerpos de un mismo tipo tienen las mismas regiones constantes, pero las regiones variables difieren entre distintos clones de células *B*. En el extremo de cada brazo, las regiones variables de cada cadena ligera y de la cadena pesada se pliegan para crear un sitio de unión al antígeno. La imagen la preparó Olson con los mismos programas de ordenador utilizados para generar la figura 1.



5. ESTRUCTURA DE UN ANTICUERPO. Cabe analizarla en términos de dominios repetidos, o unidades que se repliegan independientemente. Una cadena ligera consta de dos de esos dominios; las cadenas pesadas que se muestran tienen cuatro dominios, aunque las hay con cinco. Dentro de un dominio, la cadena polipeptídica adopta un modelo característico de plegamiento, que contiene varios filamentos de la subestructura; se denomina hoja beta. La región variable de cada polipéptido está confinada a un solo dominio, situado en el extremo amínico de la cadena. Tres lazos (denominados regiones hipervariables) del dominio variable contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno. La estructura de los dominios se muestra aquí esquematizada; en realidad, el patrón de plegamiento es mucho más complejo. Dominios similares aparecen en la proteína del receptor de la célula *T* y en las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad que identifican las células de un individuo. Probablemente las tres familias de moléculas evolucionaran a partir de un antecesor común.

cada cadena se encuentran tres pequeños segmentos, cuyas secuencias de aminoácidos son especialmente diversas. Estos segmentos "hipervariables" se reúnen al final de cada brazo, formando una hendidura que actúa de sitio de unión con el antígeno. La especificidad de la molécula depende de la forma de la hendidura y de las propiedades de los grupos químicos que recubren sus paredes; por tanto, la naturaleza del antígeno reconocido por un anticuerpo está determinada, fundamentalmente, por la secuencia de aminoácidos de las regiones hipervariables.

Es preciso mencionar otro aspecto de la estructura de los anticuerpos. Ni siquiera en las regiones constantes son idénticas todas las moléculas. En los mamíferos, las regiones constantes de la cadena ligera son de dos tipos, kappa y lambda. Las regiones constantes de la cadena pesada son cinco: mu, delta, gamma, épsilon y alfa. Los anticuerpos que poseen las mismas regiones variables, pero diferentes clases de cadena pesada, reconocen a los mismos antígenos, si bien desempeñan papeles distintos en la respuesta inmunitaria. Por ejemplo, los anticuerpos unidos a la membrana que sirven de receptores en las células *B* llevan incorporadas cadenas mu o delta, mientras que la mayoría de los anticuerpos secretados en respuesta a un antígeno contienen cadenas gamma o alfa.

Durante muchos años, dos teorías contrapuestas han pretendido explicar el origen genético de la diversidad de los anticuerpos. Una escuela de pensamiento mantenía que la línea germinal (el complemento de genes que pasa de una generación a la siguiente) debía contener un gen para cada uno de los polipéptidos que, en última instancia, aparecen en los anticuerpos. Así, los genes de las inmunoglobulinas se expresarían exactamente como lo hacen los de cualquier otra proteína, sin necesidad de ningún mecanismo especial de elaboración. El modelo, en cambio, requeriría un enorme número de genes de inmunoglobulinas.

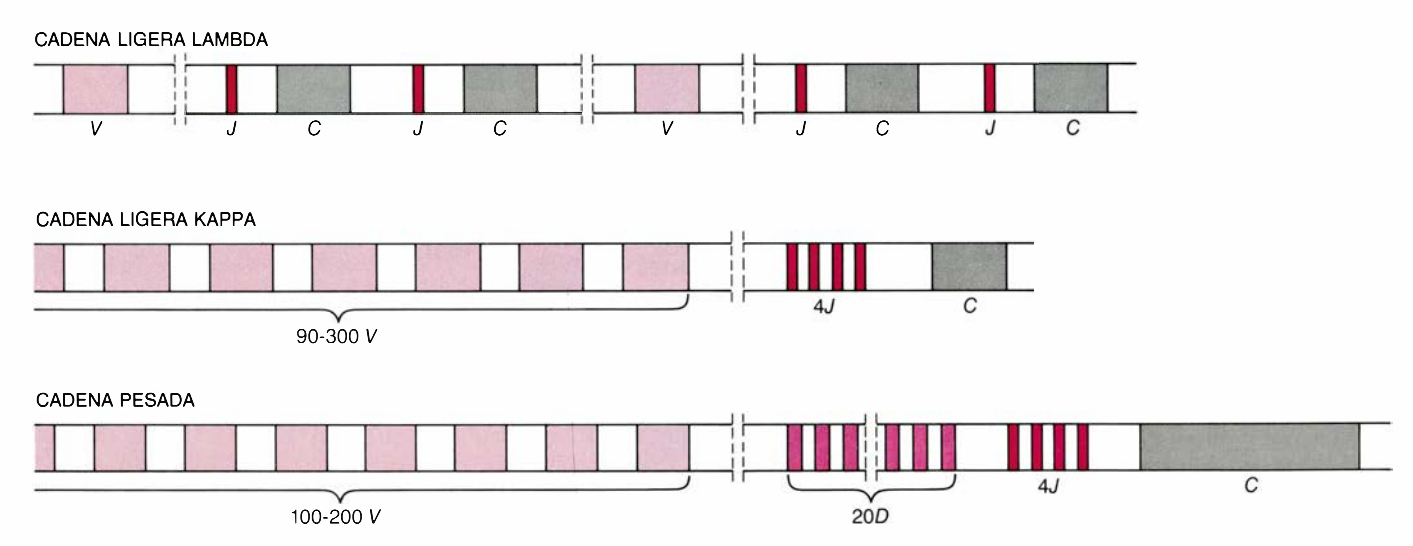
La segunda teoría defiende que en la línea germinal existe sólo un pequeño número de genes de anticuerpos y que, de alguna manera, estos se diversifican a medida que los linfocitos *B* emergen de sus células madre. En otras palabras, la diversificación se produce en las células somáticas (las que no tienen funciones reproductoras) y no en las germinales.

En 1965, William J. Dreyer y J. Claude Bennett, del Instituto de Tecnología de California, propusieron una interesante variante de la teoría de la línea germinal. La hipótesis era que, para cada tipo de polipéptido del anticuerpo, la línea germinal contendría muchos genes *V* (uno por cada una de las posibles regiones variables) y un solo gen *C* para la región constante. A medida que la célula madurara, se seleccionaría al azar uno de los genes *V*, que se combinaría con el gen *C* para crear un fragmento único de ADN que codificara el polipéptido completo.

El modelo de Dreyer y Bennett presenta ciertas características atractivas. Hace un uso eficaz del genoma y ofrece una explicación natural del porqué de la gran variación en una porción de las moléculas de anticuerpo y la constancia en otra. Sin embargo, hasta mediados de la década de 1970, un importante obstáculo impedía aceptar la teoría: precisaba algún mecanismo de reordenación de los genes en las células somáticas. No se conocía mecanismo alguno de esa índole y muchos investigadores consideraban poco probable su existencia. Las doctrinas de que un gen siempre codifica un polipéptido y de que el genoma permanece constante a lo largo de todo el desarrollo de un organismo constituían a la sazón principios fundamentales de la biología, universalmente establecidos.

Durante los últimos 10 años, la aplicación de técnicas de ADN recombinante al estudio de los genes de las inmunoglobulinas ha demostrado que, en efecto, sufren recombinación somática, pero mucho más complicada de lo que Dreyer y Bennet suponían. A través de estas complejas reordenaciones se genera una enorme diversidad en las regiones *V*.

La primera prueba de recombinación somática en los genes de inmunoglobulina la encontraron Nobumichi Hozumi y el autor, en 1976, cuando ambos trabajaban en el Instituto de Inmunología de Basilea. En nuestros experimentos utilizábamos enzimas de restricción, que cortan el ADN por puntos caracterizados por una determinada secuencia de nucleótidos. Los resultados mostraban que, en las células embrionarias de ratón, a las secuencias de



6. GENES DE ANTICUERPOS. Se encuentran en pequeños segmentos ampliamente dispersos por el genoma. En las moléculas de anticuerpo de mamífero aparecen dos clases de cadena ligera. Para la cadena ligera lambda del ratón existen dos genes *V*, que codifican la mayor parte de la región variable, y cuatro genes *C*, para la región constante. Antes de cada gen *C* se encuentra un pequeño segmento de ADN, denominado *J* (por "juntar"), que especifica el resto de la región variable. Cada gen *V* puede combinarse con un par cualquiera de genes *J* y *C*. Para la cadena ligera kappa existen unos cuantos centenares de segmentos *V*, cuatro segmentos *J* y un solo gen *C*. Los genes de las cadenas pesadas son similares, salvo en que el ADN de la región variable está más subdividido aún: además de los segmentos *V* y *J* hay unos 20 segmentos *D* (por "diversidad"). Cada conjunto de genes se halla en un cromosoma diferente. Los genes del receptor de la célula *T* están organizados de manera muy parecida a como lo están los genes de la cadena pesada. Los dibujos del artículo son obra de Gabor Kiss.

ADN que codifican las regiones *V* y *C* de las cadenas ligeras las separaba cierta distancia. En una célula madura que secrete anticuerpo se hallan mucho más próximas. (Este último hallazgo se obtuvo en un trabajo realizado con células de un mieloma, un cáncer de linfocitos, y no con células *B* normales. El cultivo de esas células malignas resulta mucho más fácil.)

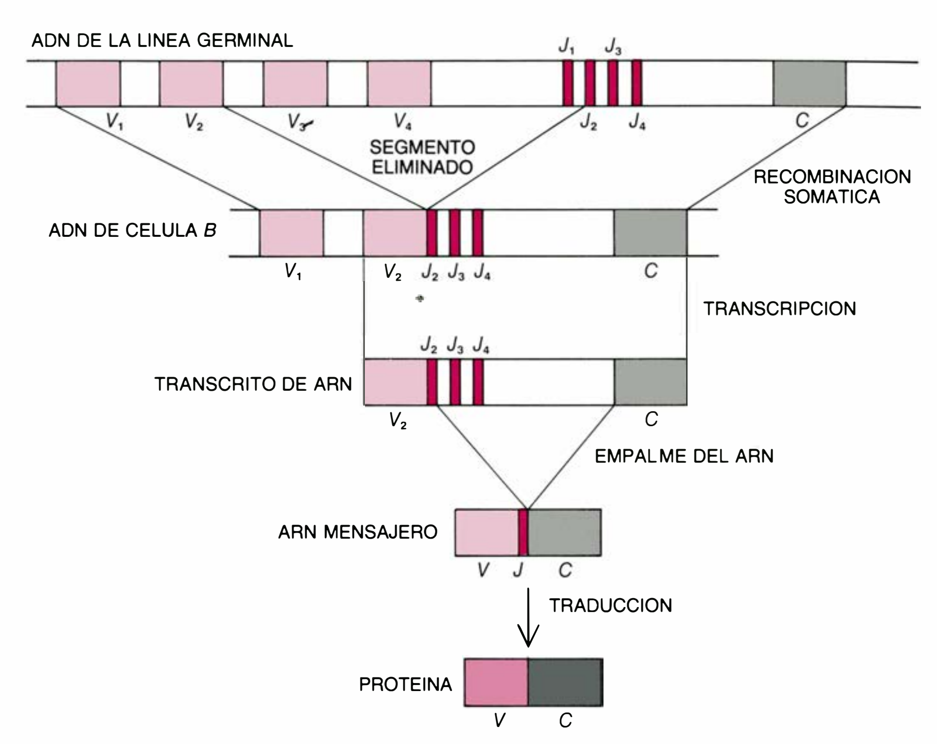
Los mecanismos responsables de la mezcla de las secuencias de ADN de las inmunoglobulinas se aclararon al lograrse la clonación de fragmentos de ADN en bacterias y someterlas luego a análisis, ensayos que realizaron por primera vez Ora Bernard y el autor en Basilea, en colaboración con Allan Maxan y Walter Gilbert, de la Universidad de Harvard. Trabajando con un clon de ADN procedente de células embrionarias de ratón, determinamos la secuencia de nucleótidos en un segmento que comprendía un gen *V* de una cadena ligera lambda. Ante nuestro asombro, encontramos que faltaban los nucleótidos correspondientes a los 13 últimos aminoácidos de la región variable. Los descubrió Christina Brack, de nuestro laboratorio. El fragmento que faltaba estaba separado, por miles de pares de bases, del ADN que codificaba el resto de la región *V*, y se hallaba unos 1300 pares de bases antes (en sentido contrario al de la transcripción) del comienzo de la región *C*. Ese pequeño segmento interpuesto se ha designado *J* (por "juntar"). Las cadenas lambda se ensamblan combinando los segmentos *V, J* y *C* dispersos.

Poco después se realizó un análisis similar de la cadena ligera kappa y de la región variable de la cadena pesada. En el trabajo participaron varios laboratorios, principalmente el nuestro de Basilea, el de Philip Leder, de los Institutos Nacionales de la Salud de los Estados Unidos, y el de Leroy E. Hood, del Instituto de Tecnología de California. También la cadena kappa resultó estar codificada por segmentos *V, J* y *C*, descubriéndose, además, múltiples copias de los segmentos *V* y *J*: existen varios centenares de segmentos *V*, que difieren ligeramente en su secuencia de aminoácidos, y cuatro segmentos *J* distintos. El número de posibles regiones variables de la cadena kappa es el producto de esas cifras.

La diversidad potencial de las cadenas pesadas resulta aún mayor. Además de los segmentos *V* y *J*, los genes para la región variable de la cadena pesada contienen un tercer fragmento, designado *D* (por "diversidad"). Las células de la línea germinal del ratón contienen varios centenares de segmentos *V*, unos 20 segmentos *D* y cuatro segmentos *J*. En principio pueden combinarse en bastante más de 10.000 maneras. La combinación de una cadena ligera con otra pesada proporciona, probablemente, más de 10 millones de sitios de unión al antígeno distintos.

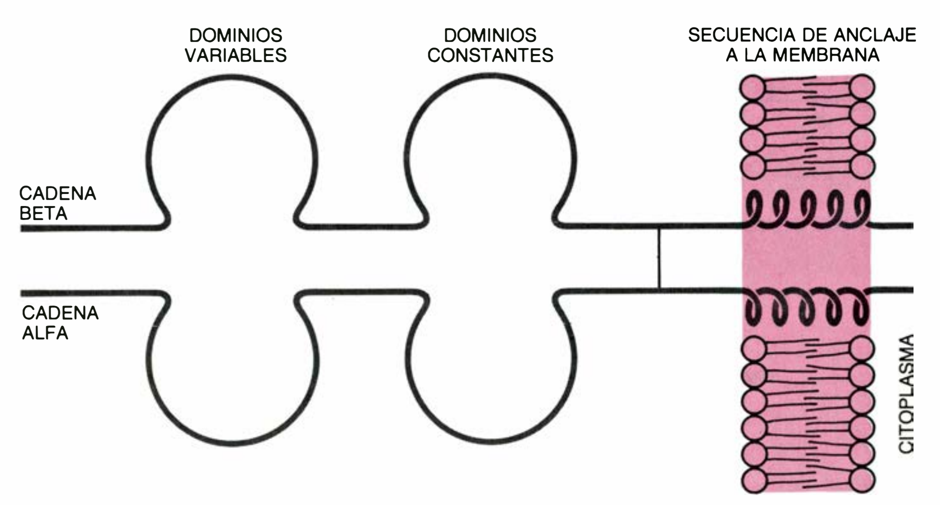
El ensamblaje de un gen de inmunoglobulina funcional se produce en dos fases. Primero, se empalman en el ADN los segmentos *V* y *J* de una cadena ligera, o los segmentos *V, D* y *J* de otra pesada. Luego se transcribe en ARN el fragmento entero de ADN, que contiene el complejo *V/J* o el *V/D/J*, más el gen *C* y el intrón (secuencia intercalada que no codifica) que los separa. Finalmente, se elimina el intrón y el ARN mensajero sale del núcleo para traducirse a proteína.

La segunda fase del proceso se fundamenta en mecanismos de rotura del ARN comunes en muchas familias de genes de las células eucariotas. La primera fase, en la que es el propio ADN, y no su transcrito de ARN, lo que se altera de modo tan específico, resulta menos habitual y quizá constituya una característica exclusiva del sistema inmunitario. Sin duda se hace uso de un conjunto de enzimas capaces de reunir segmentos distantes *V, D* y *J*, a menudo eliminándose todo el ADN que los separa. No se han aislado aún esas enzimas, pero sí se han descubierto secuencias señalizadoras que probablemente guíen su actividad. Por ejemplo, justo después de cada gen *V* de la cadena kappa aparece un patrón distintivo compuesto por un heptámero, o unidad de siete nucleótidos, seguido de un espaciador y un nonámero, unidad formada por nueve nucleótidos. Delante mismo del segmento *J* se encuentra otro patrón, aproximadamente complementario, formado por un nonámero, un espaciador y un heptámero. Estas unidades bien pudieran proporcionar un molde para las enzimas que cortan y reempalman la doble hélice. Secuencias señalizadoras semejantes se hallan en los genes de las cadenas pesadas, dispuestas de suerte tal que se incluye un segmento *D* entre los segmentos *V* y *J*.



7. ENSAMBLAJE DE UN GEN PARA ANTICUERPO a partir de fragmentos dispersos. Se realiza en dos etapas, que se muestran para el caso de una cadena ligera kappa. En primer lugar, los segmentos *V* y *J* seleccionados al azar se empalman gracias a enzimas que eliminan el ADN intercalado entre ellos. Desaparecen en este ejemplo los segmentos V_3, V_4 y J_1, con lo que quedan juntos V_2 y J_2. A continuación se transcribe a ARN el ADN que va desde el principio de V_2 hasta el final del gen *C*. Enzimas convencionales, de las que cortan y empalman el ARN y participan en la expresión de muchos genes, escinden el ARN desde el extremo de J_2 hasta el inicio de *C*. La secuencia resultante de ARN mensajero se traduce entonces a proteína.

Las ingentes combinaciones generables a partir de varios centenares de fragmentos de genes constituyen la clave de la diversidad de los anticuerpos, pero existen al menos otras dos fuentes de diversidad. Una es la falta de precisión de la maquinaria de empalme del ADN que funde los segmentos *V, D* y *J*. El sitio de unión puede



8. ESTRUCTURA DEL RECEPTOR DE LA CELULA *T*. Aun cuando no se conoce en detalle, se han identificado sus polipéptidos componentes. Cada molécula de receptor comprende una cadena alfa y otra beta; cada una de las cadenas, a su vez, comprende un dominio constante y un dominio variable. Una región rica en aminoácidos hidrófobos, y por tanto lipidosoluble, ancla la proteína en la membrana de la célula *T*.

variar en algunos pares de bases. Más aún, en ocasiones se insertan pares de bases nuevos durante el proceso de combinación de los segmentos. Obviamente, ambos tipos de cambio pueden alterar la secuencia de aminoácidos del polipéptido. En consecuencia, hasta los anticuerpos dictados por el mismo conjunto de segmentos de genes pueden presentar sitios de fijación al antígeno ligeramente diferentes.

Otra fuente importante de diversidad es la mutación somática. En 1970, Martin Weigert, a la sazón en el laboratorio de Melvin Cohn, del Instituto Salk de Estudios Biológicos, determinó las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras lambda procedentes de 18 mielomas de ratón. Todos los ratones pertenecían a la misma cepa endógama, y por tanto debían ser genéticamente idénticos. Wiegert encontró, efectivamente, que 12 de las cadenas lambda eran idénticas, si bien las otras seis diferían de la secuencia mayoritaria y entre sí. Una explicación verosímil era la ocurrencia de cambios genéticos espontáneos en las células en desarrollo, pero no se obtuvo prueba alguna convincente de esa mutación somática hasta que se clonaron los genes de la inmunoglobulina y se determinó su secuencia de bases. En 1977, Brack y Bernard demostraron que la cepa endógama de ratones llevaba en la línea germinal un solo gen de región *V* para la cadena lambda, y que su secuencia de nucleótidos correspondía a la de aminoácidos encontrada en 12 de los mielomas. La conclusión lógica fue que las seis variantes surgieron por mutación somática.

Desde entonces se han venido comparando las secuencias de aminoácidos con las secuencias de nucleótidos de la línea germinal en un buen número de cadenas kappa ligeras y de cadenas pesadas. En todos los casos, la diversidad observada en las proteínas ha sido mayor que la del ADN de la línea germinal. Las mutaciones se encuentran en el dominio variable y en las regiones inmediatamente adyacentes, pero no en los dominios constantes. Cálculos de la tasa de mutación sugieren que debe producirse un cambio en la región *V* en tres de cada 30 divisiones celulares, ritmo varios órdenes de magnitud superior a la tasa media de mutación de los genes eucariotas. Parece, por tanto, que las células *B* o sus progenitoras disponen de un aparato enzimático capaz de inducir mutaciones en la región variable de los genes de la inmunoglobulina. Se desconoce hoy absolutamente cuál pueda ser la naturaleza de tales enzimas.

Sorprende la presencia simultánea de mecanismos combinatorios y mutatorios que favorecen la diversificación de los genes de los anticuerpos. ¿Por qué han evolucionado dos sistemas para satisfacer la misma necesidad? Estudios recientes sugieren una explicación plausible. Ambos mecanismos parecen estar sujetos a un control estricto durante el desarrollo de los linfocitos *B*. Primero se realiza la recombinación de los segmentos del gen de la inmunoglobulina, que ha terminado ya cuando las células se exponen por primera vez a los antígenos. Se crea así una población de células que difieren ampliamente en su especificidad; cada antígeno seleccionará unas cuantas de ellas. Seguidamente se pone en acción el mecanismo mutatorio, durante la proliferación de los clones de células *B* seleccionadas. Alterando las bases de algunos nucleótidos, las mutaciones "afinan" la respuesta inmunitaria, creando genes de inmunoglobulinas cuyos productos se acomodan mejor al antígeno.

Resulta difícil cuantificar los efectos, sobre la diversidad de los anticuerpos, que ejercen la falta de precisión en el empalme del ADN, la inserción de pares de bases y la mutación somática. No cabe duda de que centuplican, por lo menos, el número de sitios distintos de unión al antígeno. Por tanto, si los mecanismos combinatorios por sí solos dan lugar a 10 millones de anticuerpos distintos, el número total podría fácilmente superar los mil millones.

Dado lo intrincado de las células *B* y de su maquinaria productora de anticuerpos, cuesta hacerse cargo de que sólo constituyen la mitad del sistema inmunitario. Las células *T* son tan complejas cuan esenciales para la competencia inmunológica. Un animal desprovisto de células *T* no puede organizar una respuesta inmunitaria eficaz frente a la mayoría de los antígenos, aun cuando sus células *B* estén intactas.

Se conocen tres subpoblaciones de células *T*, todas ellas de aspecto idéntico pero de función diversa. Las células *T* citotóxicas matan directamente sus células diana, pero se ignora el método que siguen: la célula *T* citotóxica se une a su diana, sin englobarla (como haría un macrófago), y le provoca una lesión mortal. A las otras poblaciones de células *T*, denominadas células *T* coadyuvantes (*helper*) y células *T* supresoras, les corresponde un papel regulador. Cuando reconocen un antígeno, las coadyuvantes estimulan a otros componentes del sistema inmunitario, por ejemplo, las células *B* y otras células *T* específicas de ese antígeno. Las células supresoras ejercen un efecto totalmente opuesto, es decir, disminuyen la actividad de esos mismos grupos de células.

La denominación de coadyuvantes parece sugerir un papel subsidiario o subordinado, como si esas células simplemente favoreciesen una respuesta que también se daría en su ausencia. En realidad, las células *T* coadyuvantes quizá constituyan el conmutador principal del sistema inmunitario. Las células *B*, por ejemplo, reconocen antígenos sin requerir estimulación alguna por parte de las células *T*, pero su proliferación y diferenciación a término sí suele exigir una activación por parte de las células *T* coadyuvantes. Igual importancia parece corresponder a las células *T* supresoras: la retroalimentación negativa permite que la respuesta inmunitaria se autolimite. Quizá partici-

pen también en la eliminación de células *B* y *T* dirigidas contra elementos del propio organismo.

Por ser específicas para un antígeno, las células *T* deben poseer moléculas receptoras análogas a las inmunoglobulinas ligadas a la membrana de las células *B*. Hace más de 20 años que se conoce ese hecho, pero la identificación y posterior análisis de los receptores de las células *T* han resultado extremadamente laboriosos, pues no se secretan en gran cantidad, como ocurre con los anticuerpos. Se vislumbraron los receptores por primera vez en experimentos realizados por James P. Allison, de la Universidad de Texas en Austin, John W. Kappler, del Hospital Nacional Judío de Denver, y Ellis L. Reinherz, de la Facultad de Medicina de Harvard. Prepararon anticuerpos que se unían a una proteína de la superficie de la célula *T*; la proteína así identificada parecía un buen candidato para el papel de receptor, pues su estructura difería entre clones de células. La masa de la proteína venía a ser unos dos tercios de la de una inmunoglobulina y constaba de dos subunidades que se designaron alfa y beta.

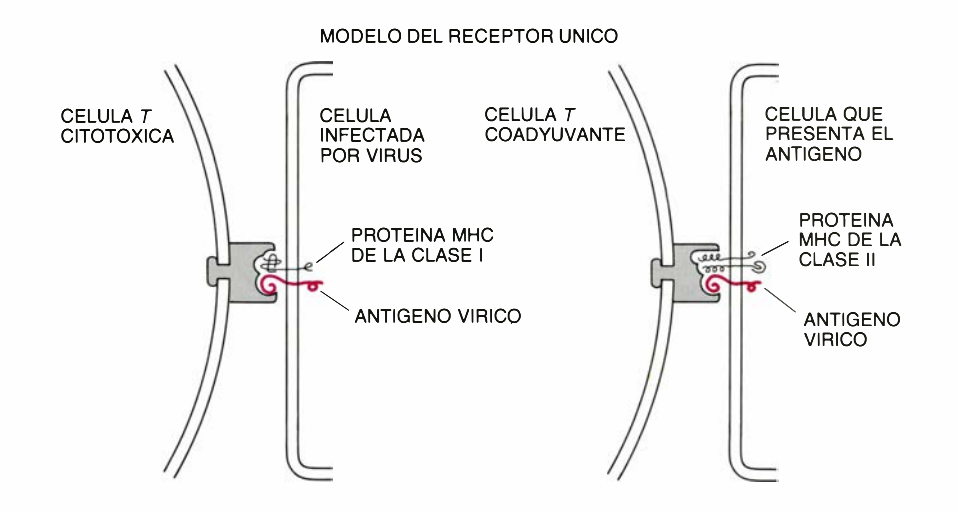
En 1984, Tak W. Mak y sus colegas, de la Universidad de Toronto, y Mark M. Davis y colaboradores, de la Facultad de Medicina de Stanford, clonaron y determinaron la secuencia de un gen que se expresa y se reordena en las células *T*, aunque no en las células *B*. Mak trabajó con células procedentes de una leucemia humana de células *T* y Davis con un hibridoma, una línea celular creada por la fusión de una célula *T* coadyuvante de ratón con una célula *T* maligna. A pesar de tan dispares procedencias, los dos genes codificaban la misma proteína.

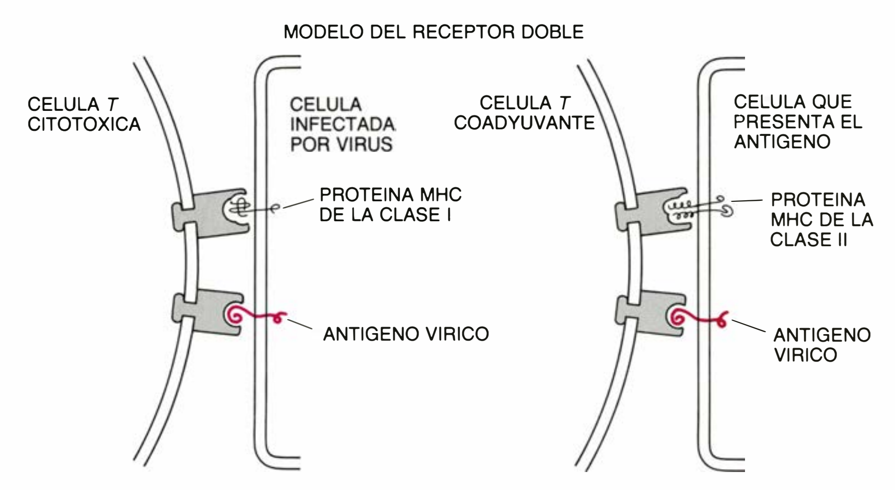
Las secuencias de nucleótidos analizadas por Mak y Davis eran homólogas a las de los genes de inmunoglobulinas, observándose, además, indicios de un parecido familiar, en una escala mayor, con las inmunoglobulinas. Los genes aparecen divididos en segmentos dispersos, que pueden reordenarse en el transcurso del desarrollo de la célula *T*; los segmentos que quedan más próximos al extremo amínico del polipéptido son variables, en tanto que los segmentos situados en el lado contrario muestran una secuencia constante. Al igual que ocurre en las inmunoglobulinas unidas a la membrana, una serie de aminoácidos hidrófobos, próximos al extremo carboxílico de la proteína, anclan la molécula en la membrana. Una determinación directa de los aminoácidos, obra de Reinherz y sus colaboradores, ha confirmado luego que los genes especifican la subunidad beta del receptor de la célula *T*.

Harno Saito, que trabajaba entonces en mi laboratorio del Instituto de Tecnología de Massachussetts, y David M. Kranz, en el laboratorio de Herman N. Eisen, también en el MIT, aislaron otros dos clones de ADN de células *T*. En este caso, los genes procedían de células *T* citotóxicas de ratón y, sin embargo, la porción más próxima al extremo terminal era idéntica a la región constante del gen para la cadena beta de la célula coadyuvante. La segunda secuencia de ADN tiene numerosas propiedades en común con los genes de la cadena beta. Homóloga a los genes de la inmunoglobulina, está formada por segmentos que sólo se reordenan y expresan en las células *T* y posee un segmento hidrófobo de anclaje. La hipótesis lógica era que el gen codificaba la cadena alfa de la molécula receptora.

Sin embargo, poco tiempo después, Saito aisló un tercer gen a partir del mismo clon de células *T* citotóxicas. Presentaba también todas las propiedades esperadas en un receptor de célula *T*, además de otro factor en su favor. El análisis químico de la proteína, realizado paralelamente a los estudios de clonación, mostró que la proteína del receptor contenía cadenas laterales de carbohidrato unidas a ella por el aminoácido asparagina. El primer candidato a cadena alfa carecía de unidades de asparagina en las posiciones adecuadas, en tanto que esta nueva poseía varias. Una determinación parcial de la secuencia de aminoácidos de la subunidad alfa, realizada por Kappler y sus colaboradores, ha confirmado que el tercero de los clones de ADN es el verdadero gen de la cadena alfa. Chien y otros, en el laboratorio de Davis en Stanford, han aislado ese mismo gen a partir de un hibridoma de célula coadyuvante.

Así las cosas, se diría que el segundo gen encontrado por Saito y Kranz, el desechado como candidato para la ca-





9. SISTEMA RECEPTOR DE UNA CELULA *T* que, a diferencia de un anticuerpo, no responde a antígenos aislados; el antígeno debe presentarse sobre la superficie de una célula que muestre también una de las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Las células *T* citotóxicas reconocen un antígeno en combinación con una proteína MHC de la clase I; las coadyuvantes lo reconocen combinado con una de la clase II; las dos moléculas están confinadas a células del sistema inmunitario, así macrófagos y linfocitos. Se ignora aún si las células *T* poseen un receptor con los dos sitios de unión o bien dos moléculas receptoras.

dena alfa, carece de función. Sin embargo, su parentesco con los otros genes es tan notable que casi con certeza debe desempeñar algún papel en el reconocimiento de los antígenos. La proteína que, según se supone, codifica se la denomina ahora cadena gamma. Más adelante examinaré la función que quizá le corresponda en la acción de las células *T*.

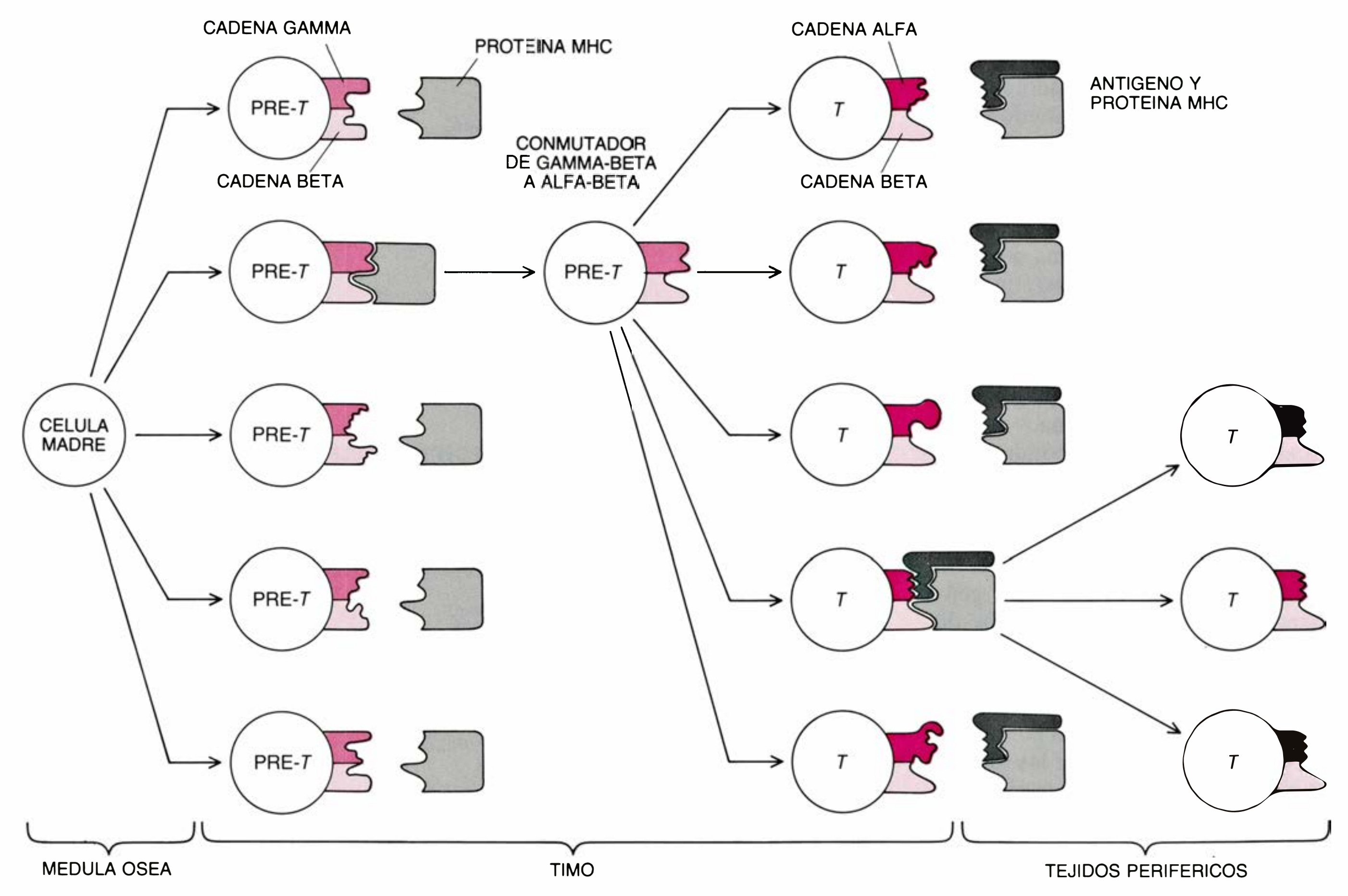
A partir de las secuencias de nucleótidos que especifican las cadenas alfa y beta cabe deducir gran parte de la estructura del receptor de la célula *T*. Cada cadena está compuesta por dos dominios, similares en su estructura general al dominio repetido de las inmunoglobulinas. El grado de homología de la secuencia con la de las inmunoglobulinas se sitúa entre el 25 y el 35 por ciento. Las dos cadenas están unidas por un puente disulfuro tendido entre la región constante y el péptido de anclaje a la membrana. Moléculas procedentes de células coadyuvantes y de células *T* citotóxicas presentan regiones constantes idénticas, tanto en la cadena alfa como en la beta.

La genética molecular de las moléculas receptoras de las células *T* resulta también notablemente similar a la de las inmunoglobulinas. Las regiones variables de ambas cadenas del receptor están codificadas por tres segmentos del gen correspondientes a los segmentos *V*, *D* y *J*, que se hallan dispersos a lo largo del cromosoma en células de la línea germinal, si bien se funden en los linfocitos *T* maduros. También se encuentran cerca de los segmentos de los receptores de las células *T* las secuencias señalizadoras heptámero-nonámero asociadas a los genes de la inmunoglobulina, indicio de que en la recombinación somática participa el mismo sistema enzimático, u otro muy parecido.

Al considerar las semejanzas que se dan entre los genes de las inmunoglobulinas y los de los receptores de las células *T* parece razonable especular que dos tipos de proteína podrían reconocer a los antígenos de la misma manera. En otras palabras, que los receptores de las células *T* podrían tener un sitio de unión al antígeno formado por racimos de aminoácidos, sumamente variables, situados en subregiones específicas de las regiones variables de las cadenas alfa y beta. Se trata de una hipótesis atractiva, en cuanto que proporciona una misma explicación para las capacidades de reconocimiento de ambas proteínas. Sin embargo, aunque la hipótesis resulte correcta, no resuelve toda la cuestión. Y ello porque las dos ramas del sistema inmunitario reconocen antígenos en circunstancias distintas. Una célula *B* puede responder a un antígeno solo, pero las células *T* únicamente se activan si el antígeno aparece expuesto sobre la superficie de una célula que lleva, además, marcadores de la propia identidad del individuo.

Para describir esta diferencia en la respuesta al antígeno habrá que referirse aquí a las moléculas que sirven de marcadores de la identidad individual. Son proteínas codificadas por un gran racimo de genes, denominado complejo mayor de histocompatibilidad, o MHC (por *Major Histocompatibility Complex*), y fabrican una tercera clase de proteínas, a las que corresponde un papel vital en el reconocimiento inmunitario.

Las proteínas MHC se descubrieron al realizar experimentos de injerto de



10. "EDUCACION" TIMICA, etapa imprescindible para el desarrollo de linfocitos *T* funcionales. El modelo de David Raulet y el autor ofrece una posible explicación del proceso de desarrollo. De acuerdo con él, las células *T* inmaduras fabrican primero proteínas receptoras con cadenas polipeptídicas denominadas gamma (*color*) y beta (*color claro*). En el timo, los linfocitos quedan expuestos a proteínas MHC: sólo las que muestran suficiente afinidad por esos marcadores de autoidentidad logran propagarse. Si las células seleccionadas abandonaran el timo, atacarían a los propios tejidos del cuerpo. Debe reducirse, por tanto, la afinidad de las moléculas del receptor por los antígenos propios. Cada receptor conserva la cadena beta del clon seleccionado, pero la gamma se remplaza por diversas cadenas alfa (*color intenso*). Las células *T* modificadas responden a una proteína MHC propia que se presente en combinación con un antígeno.

tejidos. A menos que el donante y el receptor de un injerto sean genéticamente idénticos (como en el caso de gemelos idénticos o de una raza de ratones endógama), el injerto suele rechazarse, pues el receptor desencadena una respuesta inmunitaria frente a las proteínas MHC del donante. De la abundancia de rechazos cabe deducir que los individuos sin parentesco expresan casi siempre diferentes conjuntos de genes MHC. Efectivamente, aparte de las inmunoglobulinas y de los receptores de las células *T*, las proteínas MHC son casi las más diversas que se conocen. Mientras que los anticuerpos y los receptores de las células *T* difieren entre células, las proteínas MHC difieren entre individuos.

Se han identificado dos clases de proteínas MHC. Las moléculas de la clase I constan de una gran cadena polipeptídica (del tamaño aproximado de una cadena pesada de inmunoglobulina), unida a una subunidad mucho menor, denominada microglobulina beta-2. Se encuentran proteínas MHC de la clase I en la superficie de la inmensa mayoría de las células. Las proteínas de la clase II, por el contrario, aparecen solamente en unos cuantos tipos de células que toman parte en la respuesta inmunitaria, así los linfocitos *B*, los macrófagos y las células epiteliales especializadas. Una molécula de la clase II también la forman dos cadenas polipeptídicas, ambas del tamaño de una cadena ligera de inmunoglobulina. Todos los polipéptidos MHC presentan algún grado de homología con las inmunoglobulinas, aunque el parecido no es tan intenso como el existente entre los receptores de las células *T* y las inmunoglobulinas.

Dado que la transferencia de un tejido entre dos individuos no es precisamente un fenómeno habitual en la naturaleza, el rechazo de injertos no debe ser la función primordial de las proteínas MHC. Su verdadera finalidad se encuentra en otro lugar del sistema inmunitario, concretamente en la dirección de las respuestas de las células *T*. Una célula *T* reconoce tanto un antígeno como una proteína MHC propia situada en la superficie de una célula. El requerimiento de un doble estímulo se denomina restricción MHC. Las células *T* citotóxicas responden al antígeno junto con una proteína MHC de la clase I; las células *T* coadyuvantes requieren una proteína de la clase II.

¿Qué beneficio comporta para el organismo la restricción MHC? Su efecto consiste en dirigir las actividades de las células *T* hacia la superficie de las propias células del animal, en vez de hacia las bacterias o hacia moléculas foráneas libres. Un razonamiento plausible es que la célula *T* citotóxica surgió para proporcionar protección contra la infección vírica. Cuando un virus penetra en una célula, las proteínas de la cubierta codificadas por el genoma del virus quedan expuestas sobre la membrana de la célula. Por tanto, la célula infectada posee justamente el patrón de marcadores de superficie adecuado para su reconocimiento por las células *T*, es decir, una molécula foránea en combinación con proteínas nativas. Al reconocer el antígeno vírico y una de las proteínas de la clase I, la célula *T* citotóxica puede matar a la célula infectada antes de que el virus llegue a replicarse.

Las proteínas de la clase II y las células *T* reguladoras habrían evolucionado para aumentar la eficacia de la respuesta inmunitaria. Las células *T* coadyuvantes se activarían por mediación de células de presentación de antígenos que recogen antígenos circulantes y los exhiben sobre su superficie junto a proteínas MHC de la clase II. La presencia de moléculas de la clase II sobre linfocitos *B* y macrófagos quizá constituya la clave de cómo se comunican las células coadyuvantes con aquellas células y recaban así su participación en una respuesta inmunitaria.

Si una célula *T* debe reconocer dos marcadores de superficie se plantea la cuestión de si dispone de dos receptores separados o un solo receptor de doble función. Algunos experimentos recientes parecen estar a favor del modelo del receptor único, pero los resultados no son, en modo alguno, concluyentes. Si en su día se encuentra un segundo receptor, quizá se compruebe si incorpora la cadena gamma "huérfana", que posee todas las propiedades esperadas en una proteína receptora pero que todavía no encuentra lugar en el vigente esquema de actuación de las células *T*.

Queda un posible papel para la cadena gamma. Los linfocitos *T* sólo alcanzan la madurez y funcionalidad después de un período de residencia en el timo; durante ese período de "educación tímica" las células adquieren la propiedad de reconocer antígenos solamente en combinación con las proteínas MHC del propio individuo. No ha recibido explicación definitiva la educación tímica, pero son muchos los inmunólogos que consideran que el paso esencial debe ser la selección de una subpoblación de células *T* inmaduras, en razón de su interacción con las proteínas MHC propias expuestas a ellas por las células del timo. Un modelo propone que cada célula *T* inmadura responde sólo a una proteína MHC (o a un pequeño grupo de ellas), pero la población total contiene células que responden a todos los marcadores posibles. En el timo sólo pueden propagarse y proseguir la diferenciación las células con suficiente afinidad por las proteínas MHC nativas.

Para que el esquema funcione, las células *T* inmaduras deben ser capaces de reconocer y responder a moléculas MHC que están solas, sin el antígeno acompañante. Obviamente, cuando las células *T* maduras se liberan del timo, han perdido esa capacidad; de otro modo agredirían a los propios tejidos del cuerpo. ¿Cuál es la base bioquímica del cambio de reactividad? Estudios recientes indican que, en las células *T* inmaduras, el gen de alfa se expresa en niveles bajos, en tanto que los genes de beta y gamma producen mayores cantidades de proteína. A partir de estos hallazgos, David Raulet, del MIT, y el autor han propuesto un modelo de desarrollo de la célula *T* que denominan de conmutación gamma-beta a alfa-beta.

Según ese modelo, las células inmaduras disponen de receptores formados por una cadena gamma y otra beta, y sólo responden a proteínas MHC aisladas. En el transcurso de la diferenciación, el gen de gamma entra en funcionamiento, de modo que las células maduras presentan receptores alfa-beta. El cambio reduce la afinidad de la célula por las proteínas MHC propias pero, al conservarse la cadena beta, ésta no se extingue por completo. Un mecanismo análogo opera en los glóbulos rojos de la sangre cuando realizan el paso de la forma fetal a la forma adulta de la hemoglobina.

No se ha sometido aún a ensayo nuestra propuesta acerca de la función de la cadena gamma, pero se dispone ya de las herramientas que habrán de permitirnos aclarar ésta y otras cuestiones sobre la naturaleza del receptor de la célula *T*. En el mejor de los casos, los estudios estructurales y genéticos proporcionarán un conocimiento de estas moléculas tan detallado como el que se tiene hoy de las inmunoglobulinas. Llegados a ese punto, quizá cupiera resolver algunos de los principales enigmas inmunológicos que siguen planteados, a saber: cómo se desarrollan los linfocitos en el timo, cómo reconocen a sus células efectoras y cómo controlan el resto del sistema inmunitario.

Base molecular de la comunicación intercelular

La comunicación hormonal de largo alcance y la de corto alcance entre neuronas se establece a través de intermediarios químicos. Aunque son sistemas que difieren por el grado de esta relación, hay moléculas mensajeras comunes

Solomon H. Snyder

La ameba, organismo unicelular, es capaz de realizar todas las funciones necesarias para mantener la vida. La célula asimila los nutrientes del medio, se mueve y lleva a cabo las reacciones metabólicas para adquirir energía y sintetizar nuevas moléculas. En los organismos pluricelulares la situación es mucho más compleja. Las diversas funciones se distribuyen entre distintas poblaciones de células, tejidos y órganos. Para coordinar todas estas funciones tan diversas deben existir mecanismos mediante los cuales las células individuales o grupos de éstas puedan comunicarse entre sí.

En la mayoría de los organismos superiores existen dos métodos fundamentales de comunicación intercelular: un sistema fundado en las hormonas y otro basado en las neuronas o células nerviosas. En ambos sistemas las células "hablan" entre sí a través de mensajeros químicos. La diferencia fundamental entre ambos sistemas es el nivel de relación que se establece, según sea ésta más o menos directa. Una neurona envía mensajes discontinuos a un grupo específico de células efectoras ("target cells"): células musculares, células glandulares y otras neuronas. Para enviar su mensaje, la neurona libera una sustancia química, un neurotransmisor, y lo dirige a la célula efectora. La comunicación entre una y otra célula se produce en sitios específicos que reciben el nombre de sinapsis. Las moléculas del neurotransmisor se unen a receptores (generalmente moléculas proteicas) situados en la superficie de la célula efectora y provocan así cambios químicos en la membrana celular y en el interior de la misma célula.

La acción de la hormona suele ser menos directa. Aunque existen los llamados mecanismos autocrinos y paracrinos, mediante los cuales una hormona actúa respectivamente sobre la misma célula en la que se ha producido o sobre una célula adyacente, la forma más común de comunicación hormonal es la del sistema endocrino, en el que una glándula libera hormonas que pueden actuar sobre células u órganos situados en cualquier sitio del cuerpo. Las glándulas endocrinas segregan hormonas en el torrente sanguíneo: cada célula efectora está provista de receptores que reconocen exclusivamente las moléculas de la hormona que tiene capacidad de actuar sobre esa misma célula. Los receptores retiran las moléculas de hormona del torrente sanguíneo y las incorporan a la célula.

Existen, pues, diferencias considerables entre la comunicación hormonal y la nerviosa. Las neuronas tienden a actuar sobre distancias cortas y sobre una célula en particular o grupo de ellas; la comunicación neuronal puede desarrollarse en cuestión de milisegundos. Por el contrario, una hormona puesta en libertad por una glándula determinada puede afectar a células y órganos situados en cualquier otra parte del cuerpo; la comunicación hormonal puede prolongarse varias horas.

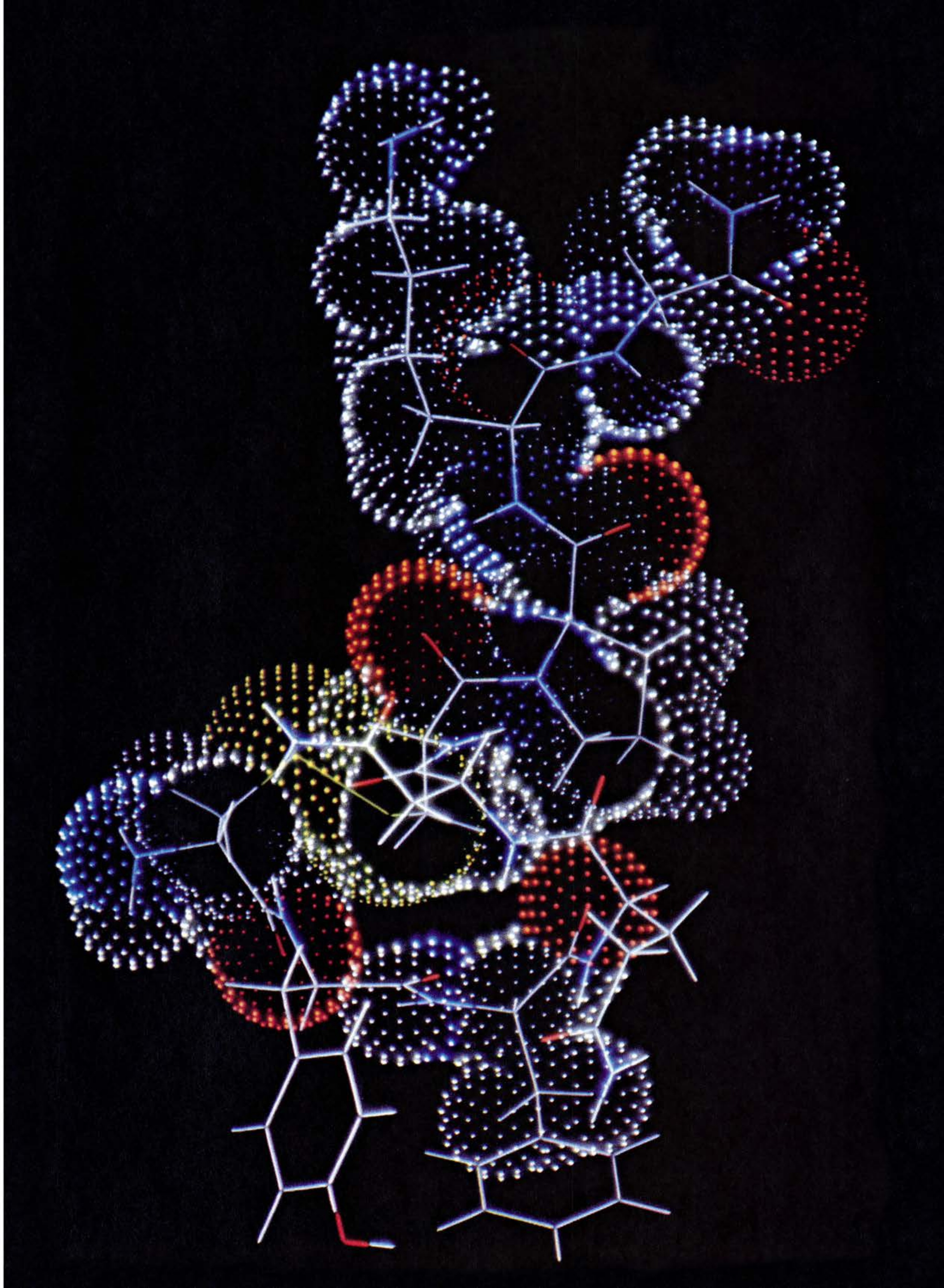
Sin embargo, en el plano molecular estos dos sistemas no son tan distintos como en un principio podría parecer. Ambos operan a través de moléculas mensajeras especiales que se ponen en contacto con receptores específicos de la célula efectora. Además, ciertos neurotransmisores parecen actuar, al igual que las hormonas, en sistemas especializados de comunicación y realizar funciones específicas.

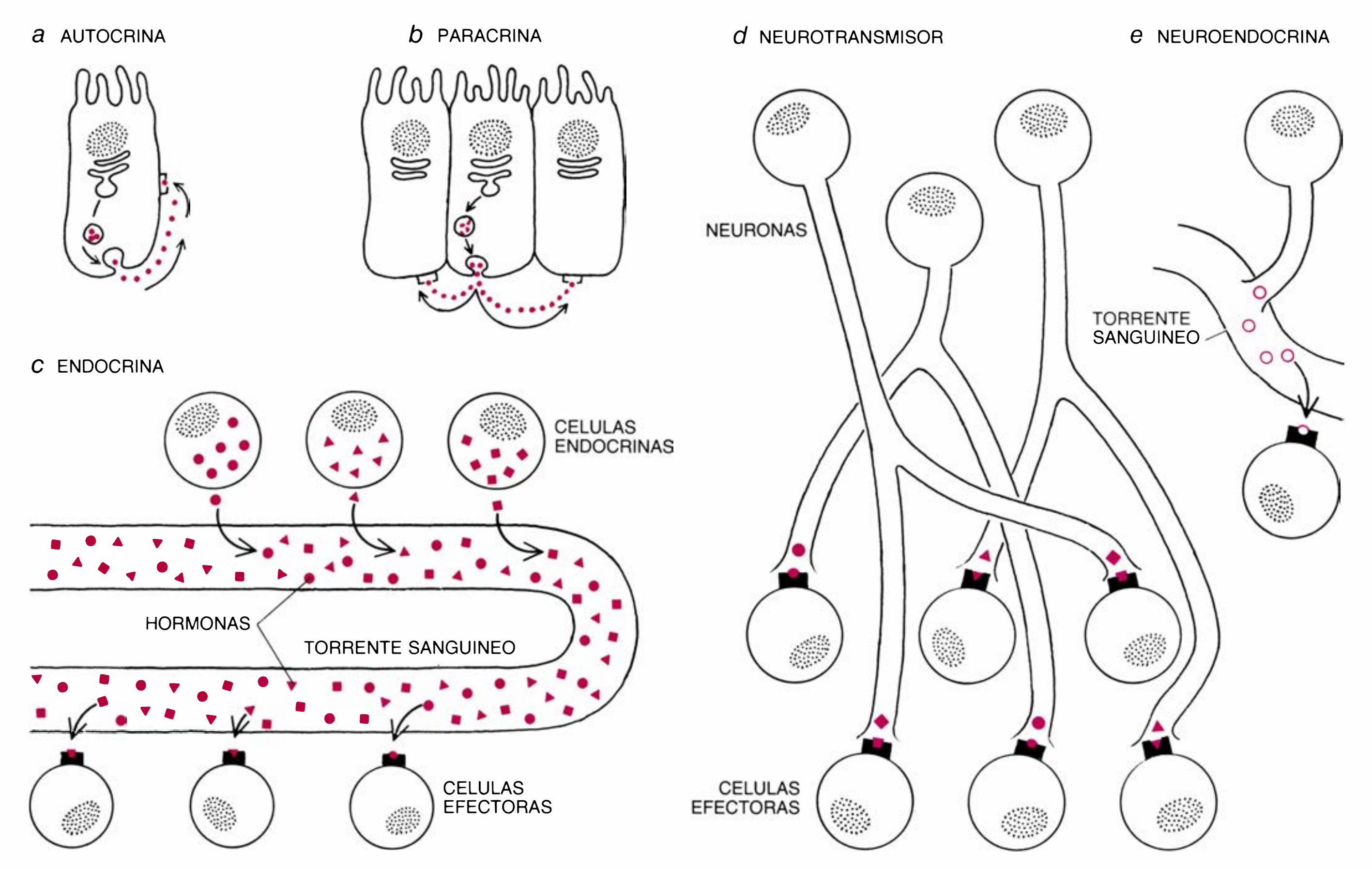
Recientemente se ha podido apreciar que existe una relación aún más estrecha entre estos dos sistemas fundamentales de comunicación intercelular: muchas de las moléculas mensajeras empleadas por un sistema las utiliza también el otro. Pensemos en la noradrenalina. En cuanto hormona, se libera por la glándula suprarrenal y estimula la contracción del corazón, dilata los bronquios y eleva la fuerza contráctil de los músculos del brazo y de la pierna. Pero la noradrenalina es también un neurotransmisor: en el sistema nervioso simpático provoca la constricción de los vasos sanguíneos y, como consecuencia, se produce una elevación de la presión sanguínea.

El mismo tipo de molécula mensajera puede llevar en el sistema hormonal un mensaje muy distinto del que lleva en el sistema nervioso. Al parecer, ciertas moléculas constituyen unos medios de comunicación particularmente adecuados.

Las moléculas que actúan como hormonas caen generalmente dentro de una de estas dos categorías de com-

1. MOLECULA DE VASOPRESINA, que transporta mensajes en los sistemas de comunicación intercelular, tanto hormonal como nervioso. En cuanto hormona, la vasopresina se libera por las células del lóbulo posterior de la hipófisis. Eleva la presión al contraer los vasos sanguíneos, y actúa como diurético al aumentar la capacidad del riñón para reabsorber el agua. Es también un neurotransmisor: substancia que lleva mensajes de una neurona a otra. Como neurotransmisor la vasopresina se encuentra en el cerebro, donde se supone que interviene en los mecanismos de la memoria. En esta imagen, realizada por Tripos Associated, las líneas continuas representan los enlaces entre los átomos; las superficies punteadas enmarcan la superficie de la molécula. El color de enlaces y puntos indica qué átomos ocupan cada región: el blanco representa el carbono o el hidrógeno, el azul el nitrógeno, el rojo el oxígeno, naranja el fósforo y amarillo el azufre.





2. METODOS DE COMUNICACION del sistema hormonal; suelen ser menos directos que los empleados por el sistema nervioso. Aunque las hormonas autocrinas (*a*) actúan sobre las mismas células que las liberan y las hormonas paracrinas (*b*) actúan sobre células adyacentes, la mayoría de las hormonas se encuentran en el sistema endocrino y actúan sobre células y órganos de cualquier parte del cuerpo. Las glándulas endocrinas (*c*) liberan hormonas al torrente sanguíneo; desde allí, entran en contacto con los receptores de las células efectoras. Los receptores de una célula reconocen las hormonas destinadas a actuar sobre esa célula y las extraen del torrente sanguíneo. Las neuronas (*d*) establecen la comunicación mediante la liberación de neurotransmisores junto a las células efectoras específicas. La comunicación nerviosa se caracteriza por mensajes discontinuos a cortas distancias. Algunas neuronas, sin embargo, cumplen una misión en el sistema hormonal: en la acción neuroendocrina (*e*) una neurona libera substancias que actúan hormonal y directamente en la sangre.

puestos químicos: péptidos y esteroides. Los péptidos son cadenas de aminoácidos (las subunidades de las proteínas). Las hormonas esteroideas son moléculas grandes y derivadas del colesterol, con el que comparten la misma estructura básica: 17 átomos de carbono unidos de tal modo que forman una serie de cuatro anillos fundidos [*véase la figura 4*]. Pequeñas diferencias en los substituyentes de los anillos de carbono dan lugar a hormonas funcionalmente muy distintas entre sí. En el hombre, entre las principales hormonas esteroideas se encuentran los glucocorticoides, como el cortisol y la corticosterona, que regulan el metabolismo de la glucosa y controlan una amplia gama de otras funciones metabólicas; los mineralcorticoides, tales como la aldosterona, que afecta al equilibrio salino corporal, y los esteroides sexuales, que incluyen la progesterona, la testosterona y las hormonas estrógenas.

Los esteroides sexuales femeninos (los estrógenos y la progesterona) han sido caracterizados de un modo mucho más completo que la mayoría de las otras hormonas. Nos proporcionan un ejemplo excelente para entender cómo se producen, se liberan y se regulan las hormonas. El estradiol, que es la principal hormona estrogénica, y la progesterona colaboran durante el ciclo menstrual normal en la preparación del útero para la implantación de un óvulo fecundado al desarrollar la pared uterina y aumentar el flujo sanguíneo hacia el útero. La caída brusca de los niveles de estradiol y de progesterona dispara la aparición de la hemorragia asociada con la menstruación.

La liberación de los esteroides sexuales, como la de la mayoría de las hormonas, está a su vez controlada por otras hormonas y por los llamados factores de liberación procedentes de dos órganos rectores, la hipófisis y el hipotálamo. En términos generales puede decirse que el hipotálamo pone en marcha la liberación de una hormona esteroidea por parte de una glándula periférica al liberar un factor que actúa sobre la hipófisis. La hipófisis libera entonces otras hormonas, que actúan sobre las glándulas periféricas. Las glándulas periféricas responden con la liberación de hormonas, que actúan sobre las células efectoras.

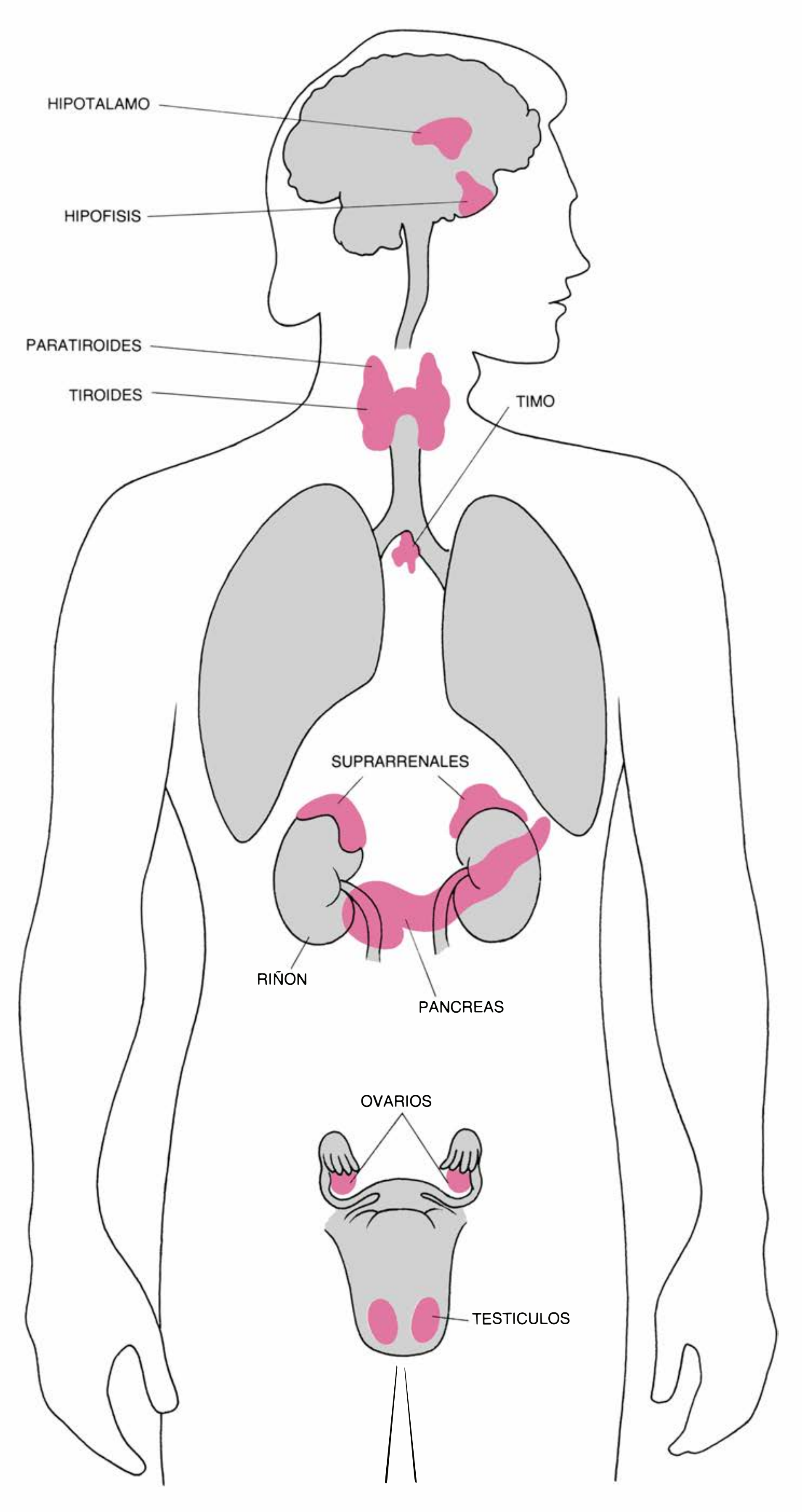
En el caso de los esteroides sexuales femeninos, el factor principal liberado por el hipotálamo recibe el nombre de factor de liberación de la gonadotropina. En el comienzo del ciclo menstrual, el hipotálamo, instado por regiones del cerebro que actúan como temporizadores, segrega el factor de liberación de la gonadotropina (conocido también con el nombre de factor de liberación de la hormona luteinizante) en el torrente sanguíneo. El factor de liberación actúa sobre los receptores que se encuentran en la superficie de las células de la hipófisis que liberan las hormonas luteinizante y folículoestimulante.

La hormona folículoestimulante y en menor grado la hormona luteinizante estimulan el desarrollo de los folículos

del ovario. Los folículos convierten el colesterol en estradiol, que vierten a la sangre. El estradiol fomenta el desarrollo del tejido muscular de la pared del útero. Unos días después, la hipófisis libera cierta cantidad de hormona luteinizante e induce un cambio en la estructura de los folículos ováricos, dando lugar a una nueva entidad que recibe el nombre de cuerpo lúteo. Los folículos transformados sintetizan menos estradiol y comienzan a convertir el colesterol en progesterona. La progesterona, que provoca un mayor flujo sanguíneo hacia el útero, hace más lentas las contracciones uterinas. Esta combinación de efectos del estradiol y de la progesterona preparan la pared del útero para recibir el óvulo fecundado. Poco después de que se haya producido la ovulación, desciende la liberación de hormona luteinizante por parte de la hipófisis, y con ello el cuerpo lúteo interrumpe la síntesis de progesterona. A continuación, las células que tapizan el útero se desprenden y comienza la hemorragia menstrual.

En el curso del ciclo menstrual las cantidades de hormonas segregadas por las distintas glándulas deben estar controladas para asegurar que la sangre circulante contenga las concentraciones adecuadas de cada hormona. Control que se consigue mediante una elaborada red de mecanismos de retroinhibición [*véase la figura 5*]. Por ejemplo, el estradiol liberado por el ovario no sólo actúa sobre las correspondientes células efectoras del útero, sino también sobre las células de la hipófisis que liberan la hormona folículoestimulante. Se evita así que la hipófisis induzca en el ovario la producción de más estradiol. El estradiol actúa también sobre el hipotálamo, donde inhibe la secreción del factor de liberación de la gonadotropina. La concentración de estradiol presente en la sangre circulante determina así la cantidad adicional que ha de liberarse, de modo parecido a como la cantidad de calor en el interior de una casa determina, por medio de un termostato, cuánto calor ha de seguir generando la caldera de la calefacción.

En el caso del estradiol existe además otro punto sujeto a retroinhibición. Los folículos del ovario, al mismo tiempo que producen estradiol, generan otra substancia, conocida con el nombre de inhibina. Esta actúa tanto sobre la hipófisis como sobre el hipotálamo: en la hipófisis, la inhibina res-



3. SISTEMA ENDOCRINO: está formado por varias glándulas y centros de control. Las glándulas endocrinas quedan todavía bajo control de la hipófisis (pituitaria), en cierto sentido, la glándula rectora: segrega hormonas que estimulan otras glándulas para que sinteticen y liberen sus propias hormonas. La hipófisis se halla, a su vez, controlada por el hipotálamo, que no es una glándula sino una región del cerebro; los factores de liberación segregados por el hipotálamo controlan la liberación de las hormonas hipofisarias.

tringe la producción de la hormona folículoestimulante, y en el hipotálamo restringe la producción del factor de liberación de la gonadotropina.

Otras hormonas esteroideas, con una amplia gama de funciones, siguen unos principios parecidos en lo que se refiere a su retroinhibición y control. Por ejemplo, los glucocorticoides, tales como el cortisol, se forman y se liberan cuando factores y hormonas procedentes del hipotálamo y de la hipófisis estimulan la corteza suprarrenal. Mientras que el estradiol actúa sólo sobre un escaso número de órganos efectores, el cortisol influye sobre casi cualquier tejido del organismo, provocando cambios metabólicos que capacitan al individuo para enfrentarse mejor con una situación de estrés continuado. En la mayoría de los tejidos, el cortisol eleva la captación de aminoácidos y su conversión en proteínas; en el hígado, acelera la conversión de aminoácidos en azúcares. La corteza suprarrenal comienza a producir y segregar el cortisol al ser estimulada por la corticotropina, una hormona que se sintetiza en la hipófisis. Y como Wylie Vale, del Instituto Salk para Estudios Biológicos, ha demostrado recientemente, la secreción de corticotropina está a su vez controlada por el hipotálamo, que segrega el llamado factor de liberación de la corticotropina.

Los factores hipotalámicos de liberación que regulan la hipófisis y sus correspondientes hormonas "rectoras", que a su vez regulan la liberación de hormonas esteroideas, no poseen una estructura esteroidea. Desde el punto de vista de su estructura química pertenecen a otro gran grupo, al de las hormonas peptídicas.

A diferencia de lo que ocurre con las hormonas esteroideas, que se sintetizan a partir de la misma molécula (el colesterol), cada hormona peptídica procede de una molécula "precursora" específica: una larga cadena de aminoácidos que contiene una o más copias de la hormona, así como otras secuencias peptídicas no relacionadas con ella. La molécula precursora, conocida también con el nombre de prohormona, se fragmenta por la acción de enzimas que liberan la hormona peptídica. Aunque cada hormona peptídica proceda de precursores diferentes, algunas enzimas que actúan sobre éstos se comparten por varios sistemas de hormonas peptídicas.

Una de las principales hormonas peptídicas es la insulina, hormona que liberan unas células específicas que se encuentran en el páncreas, las llamadas células beta. La insulina afecta a casi la totalidad de las células del organismo. Aunque su efecto más conocido sea el de hacer descender la concentración del azúcar sanguíneo al aumentar la capacidad de las células para captar la glucosa, la insulina tiene además otras funciones, acerca de las cuales tenemos aún un conocimiento bastante vago. Por ejemplo, la insulina influye en el metabolismo lipídico rebajando la concentración de las sustancias grasas en la sangre. De ahí que los diabéticos, que sufren una deficiencia de insulina, padezcan con frecuencia aterosclerosis, enfermedad en la que aparecen depósitos grasos en el revestimiento interior de los vasos sanguíneos.

Muchas de las hormonas peptídicas ejercen su acción en el intestino. La gastrina, por ejemplo, es una hormona peptídica que estimula la secreción de ácido en el estómago. En pacientes con tumores productores de gastrina aparecen con frecuencia úlceras graves debido a la formación de ácido en cantidades excesivas. La somatostatina es una hormona peptídica que se opone a los efectos de la gastrina al bloquear la secreción de ácido en determinados

CORTISOL

CORTICOSTERONA

ALDOSTERONA

PROGESTERONA

β-ESTRADIOL

TESTOSTERONA

4. TODAS LAS HORMONAS ESTEROIDEAS derivan del colesterol y poseen una estructura común de 17 átomos de carbono que dan lugar a cuatro anillos fundidos. Las diferencias entre los grupos unidos a los anillos dan lugar a hormonas funcionalmente distintas. Las moléculas representadas corresponden a las principales hormonas esteroideas. El cortisol y la cortisona promueven la formación de azúcar en el hígado y por ello reciben el nombre de glucocorticoides. La aldosterona hace que el riñón retenga el sodio en vez de excretarlo por la orina. La testosterona es la principal hormona sexual masculina y el estradiol y la progesterona las principales hormonas sexuales femeninas. (Los dibujos del artículo son de Alan D. Iselin.)

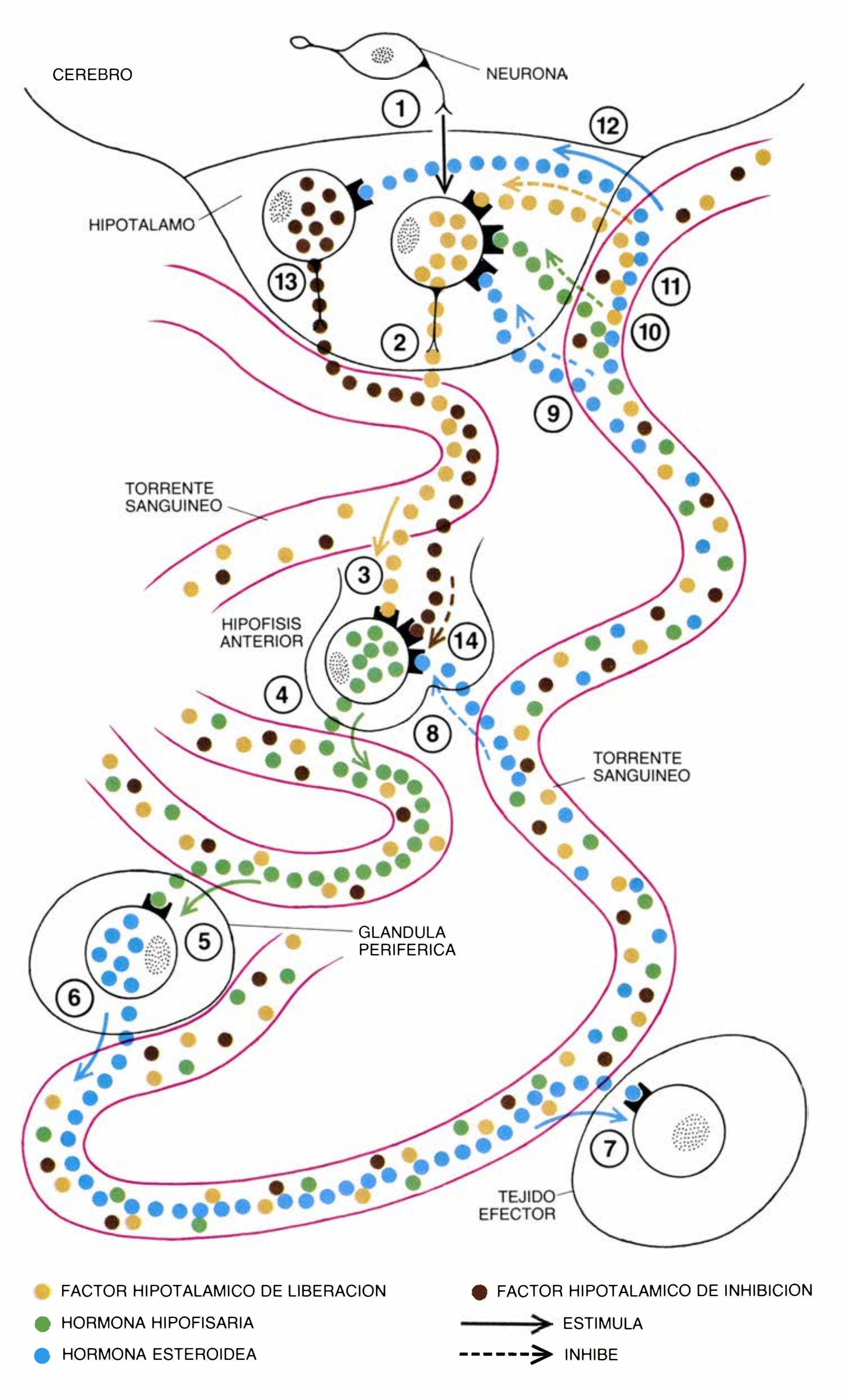
grupos celulares del estómago. Otro péptido intestinal, la colecistoquinina, se vierte al torrente sanguíneo por ciertas células del intestino; viaja a la vesícula biliar, donde aumenta el flujo de la bilis hacia el intestino, con lo que se facilita la digestión.

La colecistoquinina cumple, además, otra función: actúa de neurotransmisor en el cerebro. Muchas de las restantes hormonas peptídicas exhiben también esa misma dualidad, desempeñando el papel de moléculas mensajeras en la comunicación hormonal y en la nerviosa. Por ejemplo, el polipéptido intestinal vasoactivo es una hormona intestinal que regula la motilidad del intestino, y es al mismo tiempo un neurotransmisor cerebral. Las encefalinas, dos péptidos con muy escasas diferencias entre sí, actúan como opiáceos en el cerebro, y en el intestino son hormonas que regulan el movimiento del alimento a lo largo del tubo digestivo al alterar las contracciones rítmicas peristálticas.

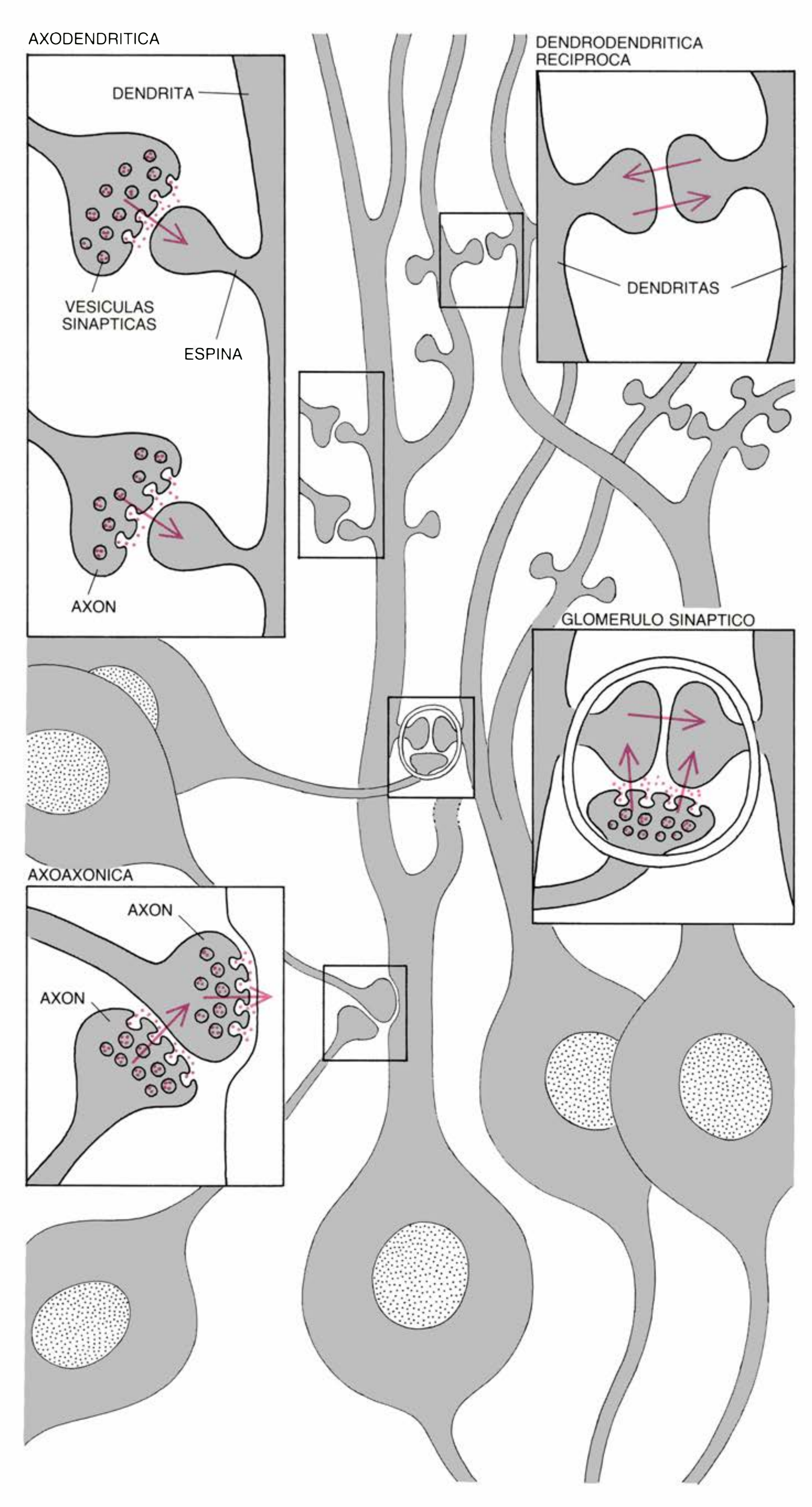
Hasta mediados los años 70 no se sabía qué péptidos actuaban como neurotransmisores, aunque se conocían ya bastante bien muchas hormonas peptídicas. Los primeros neurotransmisores identificados fueron la acetilcolina, las aminas (que son cadenas de aminoácidos con muy ligeras modificaciones) y las monoaminas (aminoácidos individuales modificados). Dentro de las monoaminas se incluyen las catecolaminas: dopamina, noradrenalina y adrenalina. Estas tres moléculas derivan del aminoácido tirosina. La noradrenalina y la adrenalina (conocidas también con los nombres de norepinefrina y epinefrina) son hormonas y al mismo tiempo neurotransmisores; las libera la médula suprarrenal, y provocan un aumento del ritmo cardíaco y de la presión sanguínea, así como un aumento del flujo de azúcar al torrente sanguíneo procedente del hígado.

En los años 60 muchos grupos de investigadores descubrieron que varios aminoácidos no modificados cumplían misiones neurotransmisoras. Uno de estos aminoácidos, el ácido gamma-aminobutírico, actúa casi exclusivamente como neurotransmisor. Otros aminoácidos neurotransmisores, así el ácido glutámico, el ácido aspártico y la glicina, son además constituyentes de las proteínas.

En total no existen más de 10 neurotransmisores que sean aminas o aminoácidos. De acuerdo con el modelo clásico de la función de neurotransmi-



5. MECANISMOS DE RETROINHIBICION Y DE CONTROL inician la liberación de las hormonas esteroideas y aseguran las cantidades apropiadas de una hormona en la sangre. Cuando neuronas del cerebro estimulan el hipotálamo (*1*), éste segrega un factor hipotalámico de liberación (*2*) en el torrente sanguíneo. Los receptores especializados de la superficie de ciertas células de la hipófisis captan algunas moléculas del factor de liberación (*3*), con lo que las células empiezan a producir y segregar tropina, una de las hormonas hipofisarias (*4*). La hormona hipofisaria viaja por la sangre hasta la glándula periférica (*5*) y hace que la glándula comience a producir, por ejemplo, una hormona esteroidea (*6*). Esta esteroidea afecta al correspondiente tejido efector (*7*). Varios bucles de retroinhibición mantienen las concentraciones correctas de hormona esteroidea en la sangre. La propia hormona esteroidea actúa sobre la hipófisis (*8*) inhibiendo la producción de la correspondiente hormona trópica hipofisaria; también actúa sobre el hipotálamo limitando la producción del factor hipotalámico de liberación (*9*). La correspondiente hormona hipofisaria y el mismo factor hipotalámico de liberación inhiben el hipotálamo y frenan la producción de factor de liberación (*10* y *11*). Además, la hormona esteroidea (*12*) insta a ciertas células del hipotálamo a producir un factor hipotalámico de inhibición (*13*) que inhibe la liberación de la correspondiente hormona hipofisaria (*14*).



6. COMUNICACION ENTRE NEURONAS. Se produce a través de hendiduras conocidas con el nombre de sinapsis. En la clásica sinapsis axodendrítica (*a*), las vesículas sinápticas en el axón de una neurona liberan el neurotransmisor hacia los receptores de la dendrita de la neurona efectora. Una dendrita puede también pasar un mensaje a otra dendrita; estos mensajes van por vía de las sinapsis dendrodendríticas. En una sinapsis recíproca dendrodendrítica (*b*), cada dendrita pasa mensajes a la otra por medio de una sinapsis separada. En otro tipo de sinapsis, en las llamadas axoaxónicas (*c*), el axón de una neurona pasa el mensaje a través del axón de otra neurona a la dendrita de una tercera neurona. En el glomérulo sináptico (*d*), el axón de una neurona pasa sus mensajes a las dendritas de otras dos; las dendritas pueden pasarse también mensajes.

sor, no sería preciso que existiesen más. Según ese modelo, el neurotransmisor vendría a ser un interruptor químico que hiciera que su neurona efectora se disparase o que, por el contrario, permaneciera inhibida. Si ese modelo fuese correcto, el cerebro sería capaz de funcionar con sólo dos neurotransmisores, uno excitador y otro inhibidor. Sin embargo, desde 1975, fecha en que se descubrió que las encefalinas eran neurotransmisores que actuaban sobre receptores de opiáceos en el cerebro, los investigadores han aislado otra cincuentena de "neuropéptidos" más. ¿Para qué sirven?

Cuidadosos estudios electrofisiológicos han puesto de manifiesto que los diferentes neurotransmisores pueden producir muchos y muy diversos efectos en la sinapsis. Existen distintos tipos de poros, o canales, en la membrana celular de la neurona efectora. Estos canales, que pueden abrirse o cerrarse por la presencia de un neurotransmisor, permiten que iones tales como el cloruro, el sodio, el potasio y el calcio atraviesen la membrana de la neurona. Parece que existen muchos tipos de canales para cada ion, y varios canales llevan tipos distintos de información eléctrica. Los neurotransmisores pueden afectar a esos canales de modos muy distintos.

Más aún, el mismo neurotransmisor puede dar origen a efectos diferentes, según sea el tipo de sinapsis sobre la que está actuando. Por ejemplo, al actuar sobre los receptores muscarínicos, que se encuentran sobre las células de la musculatura lisa del intestino, el neurotransmisor acetilcolina cierra determinados canales que normalmente permiten la salida de los iones potasio de la célula. El efecto (que no acabamos todavía de conocer bien) consiste en una excitación gradual y prolongada del músculo. Por otro lado, al actuar sobre los receptores nicotínicos, que se encuentran en los músculos esqueléticos, la acetilcolina abre los canales del sodio, con lo que se produce una contracción brusca y rápida del músculo.

Además de echar abajo la idea de que el neurotransmisor transmite sólo un mensaje de "apertura" o de "cierre", los neuropéptidos nos han llevado a reconsiderar otro aspecto del pensamiento tradicional. Creíase que cada neurona liberaba un solo tipo de neurotransmisor. En 1977, Thomas G. Hökfelt, del Instituto Karolinska de Estocolmo, descubrió que las terminaciones de muchas neuronas (tal vez de la mayoría) contenían dos o tres neu-

rotransmisores. (Uno de los neurotransmisores es invariablemente un péptido.) Al parecer, los "cotransmisores" actúan juntos de modo sinérgico para acarrear una información más útil que la que sería posible con un único transmisor. No está todavía del todo claro cómo funcionan los mecanismos de la cotransmisión.

Para explicar muchos de los rasgos de los neuropéptidos pueden servirnos las dos encefalinas. Ambas poseen en su molécula cinco aminoácidos. Difieren sólo en el quinto aminoácido: una de ellas, la met-encefalina, termina con la metionina; la otra, la leu-encefalina, con la leucina. La presencia de las encefalinas se observa en determinadas vías nerviosas discontinuas a través del cerebro, en zonas que son aproximadamente las mismas donde se encuentran los receptores de opiáceos. Esta coincidencia de localización de vías encefalínicas y de receptores de opiáceos apoya la hipótesis de que los neurotransmisores encefalínicos actúan como opiáceos.

Las encefalinas se sintetizan a partir de dos proteínas precursoras de gran tamaño, que reciben el nombre de proencefalina *A* y proencefalina *B*. La proencefalina *A* contiene seis copias de met-encefalina y una de leu-encefalina, mientras que la proencefalina *B* contiene tres copias de leu-encefalina y ninguna de met-encefalina. De aquí que todas las moléculas de met-encefalina deriven de la proencefalina *A*; la leu-encefalina puede sintetizarse a partir de cualquiera de los dos precursores.

Dentro de las moléculas precursoras cada encefalina está flanqueada por dos señales, constituidas cada una por dos aminoácidos: dos lisinas, o dos argininas, o una lisina y una arginina. Se requieren dos pasos enzimáticos sucesivos para liberar la encefalina encerrada en la molécula del precursor. En el primer paso una enzima rompe el enlace peptídico situado a la derecha de cada uno de los aminoácidos que sirven de señal [*véase la figura 7*]. La molécula resultante consiste en una molécula de encefalina con un aminoácido adicional en el extremo de la derecha. Una segunda enzima arranca este aminoácido y con ello se produce la encefalina.

La velocidad a la que se forma la encefalina depende de diversas circunstancias; se piensa que la velocidad aumenta en situaciones de estrés doloroso. La velocidad de síntesis puede estar gobernada por cambios en el ritmo de transcripción de los genes de la proencefalina o por la disponibilidad de las enzimas que rompen los enlaces peptídicos que encierran la encefalina en el interior de la molécula precursora.

Muchas enzimas pueden llevar a cabo los dos pasos enzimáticos necesarios para convertir la proencefalina en encefalina. Uno de los interrogantes más persistentes planteados por los neuropéptidos es el de si ciertas enzimas generalizadas elaboran todas las moléculas peptídicas correspondientes a hormonas y neutrotransmisores o bien existen enzimas específicas para cada péptido en particular. La solución de este problema ha de tener profundas consecuencias prácticas. Si en este proceso están implicadas enzimas específicas, sería posible diseñar agentes terapéuticos que de modo selectivo inhibieran cada una de esas enzimas, lo que permitiría bloquear la biosíntesis de sólo ciertos péptidos neurotransmisores, consiguiéndose así un control preciso sobre la neuroquímica del paciente.

Los resultados de investigaciones recientes favorecen la hipótesis de que existen enzimas convertidoras especializadas para cada neuropéptido. Lloyd D. Fricker, Stephen M. Strittmatter y David R. Lynch han aislado y caracterizado, en mi laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad Johns Hopkins una enzima, a la que hemos dado el nombre de encefalina convertasa. Arranca el aminoácido que aún permanece unido a la encefalina parcialmente liberada. Hemos visto que la encefalina convertasa se localiza de manera selectiva en los mismos sitios del cerebro donde se encuentra la encefalina, lo cual indica que contribuye a la formación de ésta en esas áreas (aunque pueda tener otras funciones en lugares distintos del cuerpo). Hemos probado ya varios fármacos que poseen una capacidad mil veces superior para inhibir la encefalina convertasa que la que poseen para inhibir otras enzimas.

Una de las consecuencias más estimulantes de la investigación sobre neuropéptidos es, pues, la posibilidad de conseguir nuevos fármacos que sean más eficaces, más específicos y más inocuos que los fármacos psicoterapéuticos hoy en uso. La inmensa mayoría de los fármacos que se recetan en psiquiatría y en neurología actúan a través de la estimulación o el bloqueo de los efectos de uno u otro neurotransmisor. La mayoría de los fármacos ejercen sus efectos al actuar sobre uno u otro de los neurotransmisores clásicos. Los transmisores peptídicos recientemente descubiertos pueden dar origen a una nueva generación de fármacos que influyan en la síntesis, liberación o receptores de cada uno de los neuropéptidos. Con un arsenal de fármacos capaces de regular cada uno de estos múltiples neuropéptidos se posibilitará una modulación más precisa del sentir y del pensar. Las posibilidades para aliviar los trastornos emocionales y neurológicos habrán aumentado considerablemente.

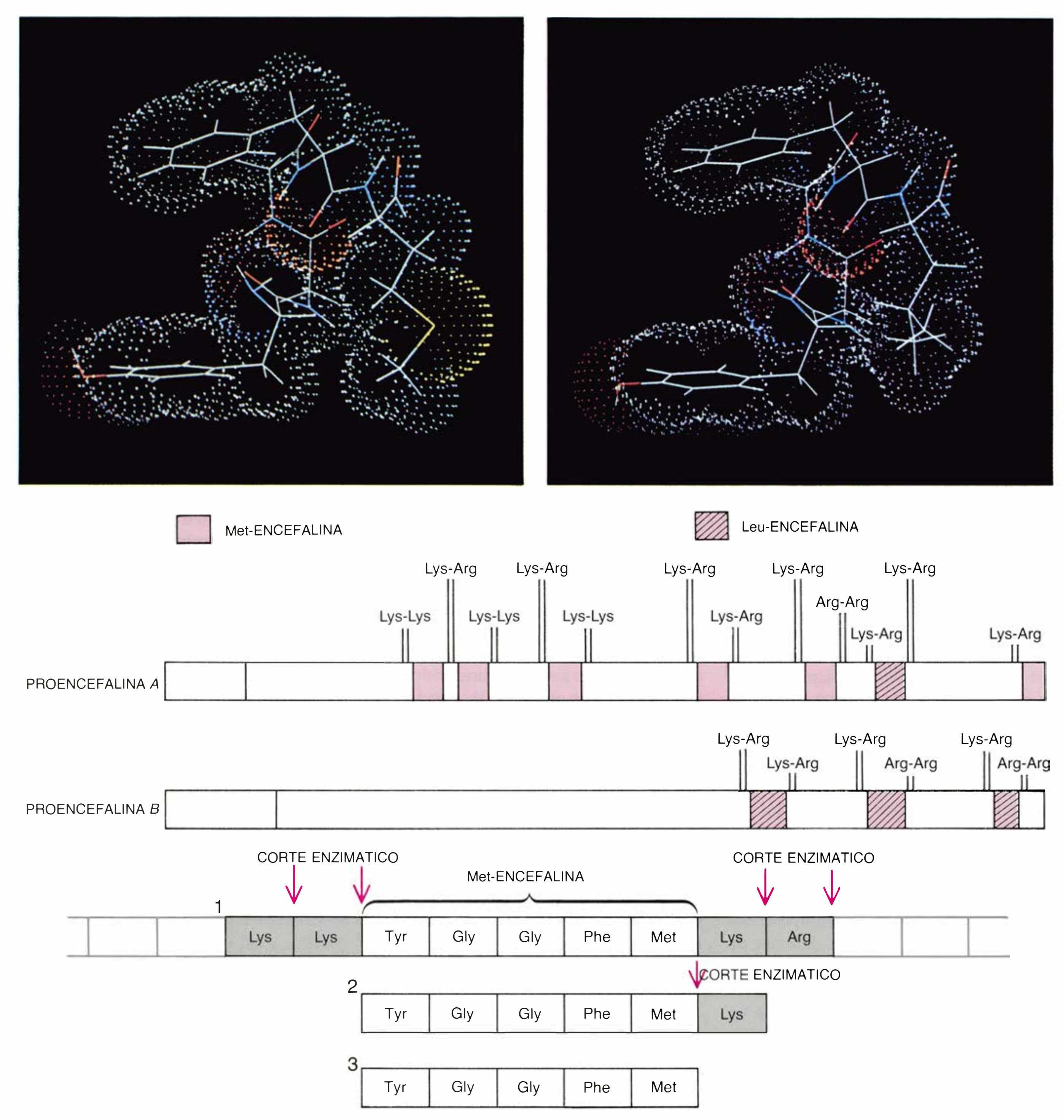
Para describir los modos de interacción entre los fármacos actuales y los transmisores podemos servirnos de la noradrenalina, una de las clásicas aminas transmisoras. La noradrenalina es un transmisor del sistema nervioso simpático, que es la parte del sistema nervioso autónomo que prepara el organismo para un gasto de energía rápido, dilatando, por ejemplo, ciertos vasos sanguíneos, acelerando el ritmo cardíaco y frenando la digestión. La noradrenalina es también un transmisor cerebral.

Las neuronas que contienen la noradrenalina, al igual que las que las que contienen las encefalinas, están localizadas en zonas muy precisas del cerebro. Una de las vías noradrenalínicas más prominentes se halla en un núcleo pequeño del troncoencéfalo conocido con el nombre de *locus coeruleus*, a partir del cual las neuronas noradrenalínicas envían axones a muchas regiones del cerebro. De este modo, el conjunto de neuronas relativamente pequeño del *locus coeruleus* puede influir sobre miles de millones de otras neuronas.

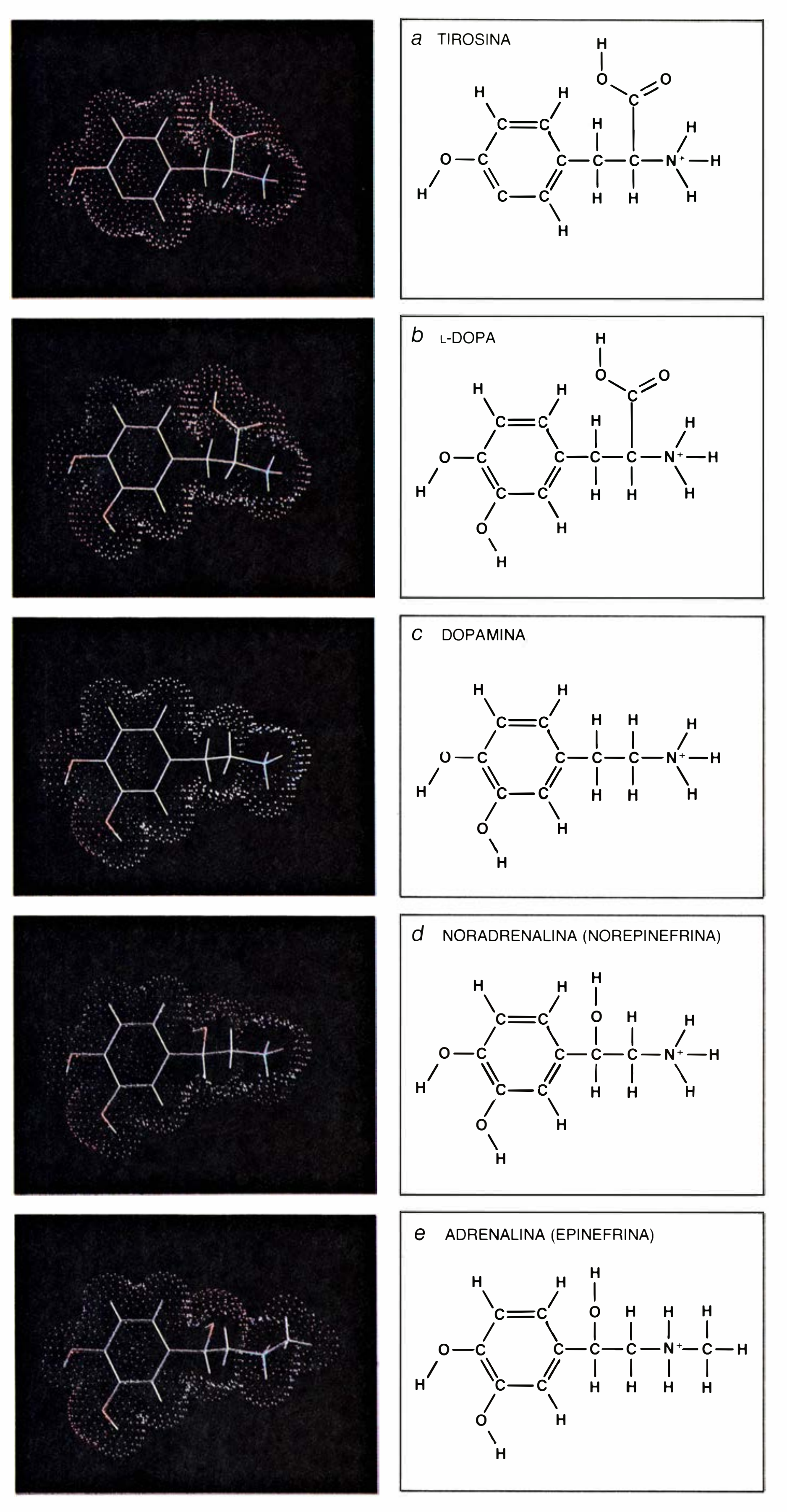
Existen cuatro tipos fundamentales de receptores noradrenalínicos, denominados alfa$_1$, alfa$_2$, beta$_1$ y beta$_2$. Los diferentes receptores norepinefrínicos se encuentran en distintos lugares del cuerpo, y así es posible diseñar fármacos que ejercen sus funciones mediante el bloqueo o la estimulación del efecto de la noradrenalina sobre un determinado tipo de receptor. Por ejemplo, en el sistema nervioso periférico, la estimulación de los receptores alfa$_1$ eleva la presión sanguínea, lo que ha hecho posible el diseño de muchos fármacos para el tratamiento de la hipertensión, que bloquean selectivamente los receptores alfa$_1$. La estimulación de los receptores beta$_1$ o beta$_2$, por otro lado, acelera el ritmo cardíaco y dilata el ár-

bol bronquial de los pulmones. Un beta estimulante puede utilizarse, por tanto, en el tratamiento del asma, y un beta bloqueante en el tratamiento de la angina de pecho.

Por desgracia, un beta estimulante administrado para tratar el asma puede acelerar excesivamente el ritmo cardíaco; un beta bloqueante, con el que se puede tratar una angina de pecho, puede agravar un caso de asma. Cabe, sin embargo, evitar estos efectos colaterales porque el corazón tiene muchos receptores $beta_1$, mientras que el pulmón tiene principalmente receptores $beta_2$. Los diseñadores de fármacos han logrado utilizar $beta_2$ estimulantes selectivos para aliviar los síntomas del asma sin causar palpitaciones cardíacas, y $beta_1$ bloqueantes para aliviar las molestias de la angina de pecho sin provocar ataques de asma. Se han diseñado también otros muchos fármacos aprovechando la multiplicidad de tipos



7. ENCEFALINAS, moléculas que actúan como neurotransmisores y como hormonas. Se forman cuando las enzimas rompen moléculas de "precursores" mucho mayores. Cada encefalina consta de una cadena de cinco aminoácidos; las dos encefalinas difieren sólo en el quinto aminoácido, que es una metionina en la met-encefalina (*arriba a la izquierda*) y una leucina en la leu-encefalina (*arriba a la derecha*). Existen dos tipos de moléculas precursoras de encefalina (*centro*). La proencefalina *A* contiene seis copias de met-encefalina y una leu-encefalina; la proencefalina *B* contiene tres copias de leu-encefalina y ninguna de met-encefalina. Dentro de las moléculas precursoras, cada copia de encefalina está flanqueada por pares de aminoácidos que actúan como señales; una señal puede estar formada por dos lisinas, dos argininas o una lisina y una arginina. Se necesitan dos enzimas para separar la encefalina de la molécula precursora. La primera (*1*) hace un corte a la derecha de cada aminoácido perteneciente a la señal (lisina o arginina), dejando una molécula de encefalina con un aminoácido adicional en el extremo de la derecha. A continuación la segunda enzima (*2*) corta el aminoácido adicional, con lo que se produce la encefalina (*3*).



8. NEUROTRANSMISORES CATECOLAMINICOS: dopamina, noradrenalina y adrenalina (que también actúan como hormonas); derivan del aminoácido tirosina. La tirosina (*a*) se transforma primero en L-dopa (*b*) por adición de un grupo hidroxilo (OH). Para formar dopamina (*c*) un hidrógeno reemplaza a un carbono unido a un grupo hidroxilo y un oxígeno. Al introducir un nuevo grupo OH se obtiene la noradrenalina (*d*) o norepinefrina. Al añadir un grupo metilo (CH_3) se forma la adrenalina o epinefrina (*e*).

de receptores existentes para la mayoría de los neurotransmisores.

Otro tipo de fármacos opera sobre un principio ligeramente diferente. Una vez liberado un neurotransmisor y después de que haya actuado sobre el receptor, su acción debe terminar para que el receptor pueda responder al siguiente impulso nervioso. La mayoría de los neurotransmisores se inactivan por un mecanismo de bombeo mediante el cual el neurotransmisor es transportado de nuevo hacia el interior de la terminación nerviosa de la que había salido. Algunos fármacos ejercen sus efectos terapéuticos mediante el bloqueo de este mecanismo de "recaptación". Por ejemplo, los fármacos antidepresivos fundamentales, los antidepresivos tricíclicos, bloquean la recaptación de noradrenalina y de serotonina y, por ende, su inactivación. Al quedar inhibidos los sistemas de recaptación de noradrenalina y de serotonina, los fármacos antidepresivos ponen a disposición de los receptores una mayor cantidad de neurotransmisor. El hecho de que tales fármacos ayuden a la curación de la depresión indica que la depresión puede deberse, en parte, a una deficiencia de nodradrenalina, serotonina y otras aminas biogénicas (aminas transmisoras que se producen en el cerebro).

Otros fármacos actúan al influir sobre enzimas que sintetizan o destruyen la molécula de noradrenalina. Por ejemplo, si inhibimos la monoaminooxidasa, enzima que degrada la noradrenalina, se podrá producir una elevación de los niveles de noradrenalina en el cerebro. La presión osmótica hace que buena parte de la noradrenalina acumulada se vea forzada a salir por las terminaciones nerviosas y actuar sobre los receptores. Los inhibidores de la monoaminooxidasa aumentan así la actividad sináptica de la noradrenalina, lo que explica su uso común como antidepresivos.

La comunicación entre células o grupos de células es crucial para la supervivencia de cualquier organismo pluricelular. En los organismos superiores, estos mecanismos se basan en la existencia de un gran número de moléculas mensajeras con un elevado grado de especialización. A medida que los investigadores vayan conociendo las propiedades y funciones de todos estos mensajeros intercelulares, se irá haciendo posible el desarrollo de agentes terapéuticos más seguros y más eficaces para condiciones tan diversas como alteraciones hormonales, cardiopatías y enfermedades mentales.

Base molecular de la comunicación intracelular

No son muchas las sustancias que suelen emplearse como señales en el interior celular. Esos denominados "segundos mensajeros" dirigen la célula en su respuesta a las necesidades del organismo

Michael J. Berridge

La división del trabajo entre las células de los organismos pluricelulares exige que una población celular sea capaz de solicitar asistencia y de responder al requerimiento de otra coordinación que se efectúa, fundamentalmente, mediante señales químicas. Sin embargo, la mayoría de las señales de llegada no alcanzan el interior celular. Dispersos por la superficie externa de la célula, a modo de antenas moleculares, se encuentran receptores que detectan la llegada de un mensajero y activan una ruta de transmisión que, en última instancia, regula procesos celulares como la secreción, la contracción, el metabolismo o el crecimiento. La principal barrera que se opone al flujo de información es la membrana plasmática celular, donde se alojan mecanismos que traducen las señales externas en otras internas, transportadas éstas por los denominados "segundos mensajeros".

En términos moleculares, el proceso depende de una serie de proteínas de la membrana celular, cada una de las cuales transmite información induciendo un cambio conformacional (una alteración de la forma y, por tanto, de la función) en la proteína adyacente. En algún punto se asigna la información a moléculas de pequeño tamaño, incluso a iones del citoplasma celular. Constituyen los segundos mensajeros, cuya difusión permite que la señal se propague rápidamente por toda la célula.

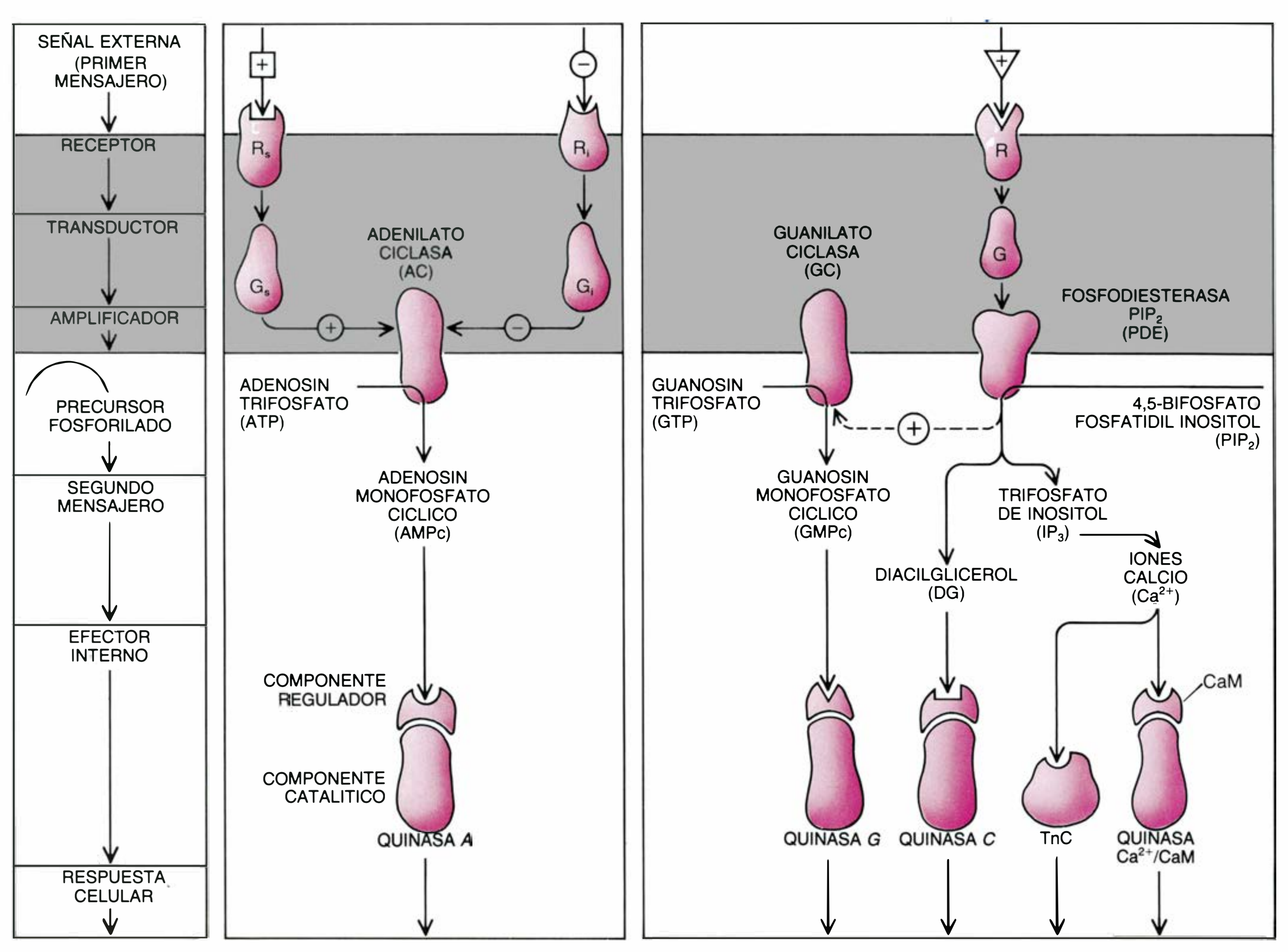
El número de segundos mensajeros parece sorprendentemente pequeño. En otras palabras, las rutas internas de transmisión en las células son notablemente universales. Con todo, los mensajeros conocidos son capaces de regular una gran variedad de procesos fisiológicos y bioquímicos. El descubrimiento de la identidad de sustancias que actúen de segundos mensajeros se ha demostrado de importancia fundamental a la hora de comprender cómo se gobierna la actividad celular. Se conocen hoy dos de las principales rutas de transmisión. Una emplea por segundo mensajero el adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico). La otra utiliza una combinación de segundos mensajeros: iones de calcio y dos sustancias, trifosfato de inositol (IP_3) y diacetilglicerol (DG), de sorprendente origen: se recaban, por digestión, de la propia membrana plasmática.

Ambas rutas tienen mucho en común. El componente inicial, es decir, la molécula receptora de la superficie de la célula, transmite información a través de la membrana plasmática, hacia el interior de la célula, por medio de una familia de proteínas *G:* proteínas de membrana que no pueden activarse a menos que se unan al guanosín trifosfato (GTP). En ambas rutas, las proteínas *G* activan una enzima "amplificadora" de la cara interna de la membrana. La enzima convierte moléculas precursoras en segundos mensajeros. Por lo general, los precursores están altamente fosforilados, esto es, son ricos en grupos fosfato (PO_4). Por ejemplo, el amplificador adenilato ciclasa convierte el adenosín trifosfato (ATP) en AMP cíclico, mientras que el amplificador fosfolipasa *C* corta el lípido de membrana 4,5-difosfato fosfatidil inositol, PIP_2, en DG e IP_3.

Por otro lado, en ambas rutas las etapas finales son similares: el segundo mensajero induce cambios en la estructura de las proteínas celulares. (En una conformación tridimensional la proteína es inactiva; en otra, interviene en funciones celulares tales como la secreción o la contracción.) Dos son las vías principales de actuación de los segundos mensajeros. En una de ellas, el segundo mensajero actúa directamente, uniéndose a la proteína (en realidad se une al "componente regulador" de la proteína), desencadenando con ello un cambio conformacional. Un ejemplo clásico de esa vía se encuentra en el músculo esquelético, donde el calcio (segundo mensajero) se une a la proteína troponina *C*, provocando un cambio conformacional que insta la contracción del músculo. En la vía alternativa, que es el mecanismo más común de actuación de los segundos mensajeros, se actúa de forma indirecta: activando una proteína quinasa, enzima que fosforila proteínas. La fosforilación (la adición de un grupo fosfato) induce un cambio en la forma de la proteína.

De todos los pasos de rutas de se-

1. ELABORACION DE UN MENSAJERO para la transmisión de señales en el interior celular. Las imágenes muestran la estructura del precursor del mensajero y la del propio mensajero. El precursor (*arriba*) es el adenosín trifosfato, o ATP, cuya función suele ser la de satisfacer las necesidades de la célula aportando energía a las reacciones químicas. En el ATP se distinguen tres partes. La base nitrogenada, llamada adenina, forma la porción superior derecha de la molécula completa; en su estructura destacan un hexágono y un pentágono de átomos de carbono (*blanco*) y átomos de nitrógeno (*azul*). La adenina se encuentra unida a otro pentágono, el del azúcar denominado ribosa, que aparece casi en el extremo inferior de la molécula de ATP. Por su parte, la ribosa está unida a una cadena de tres grupos fosfato, cada uno de los cuales consta de un átomo central de fósforo (*amarillo*) y átomos de oxígeno satélites (*naranja*). La cadena envuelve la ribosa por detrás y se extiende hacia la izquierda. Al convertirse en un mensajero intracelular, el ATP se transforma en monofosfato cíclico de adenosina, o AMPc (*abajo*). Dos de los tres grupos fosfato se eliminan y el que queda permanece unido al resto de la molécula a través de dos de sus átomos de oxígeno satélites. El grupo fosfato adquiere con ello una estructura cíclica con respecto al resto de la molécula de AMP. Las imágenes fueron generadas por ordenador, a partir de datos cristalográficos, por Tripos Associates.



2. RUTAS DE TRANSMISION CONOCIDAS. Son escasas. En términos funcionales comparten una secuencia de procesos (*izquierda*). Los mensajeros externos que llegan a las moléculas receptoras de la membrana plasmática (*gris*) activan una familia de moléculas de transductores estrechamente emparentadas, que transportan señales a través de la membrana, y a enzimas amplificadoras que, a su vez, activan las señales internas transportadas por los segundos mensajeros. La ruta que emplea el segundo mensajero AMPc (*centro*) posee receptores estimuladores (R_s) e inhibidores (R_i), que comunican ambos con la enzima amplificadora adenilato ciclasa (AC) a través de transductores estimuladores e inhibidores (llamados proteína *G*, dado que su funcionamiento requiere guanosín trifosfato GTP). La adenilato ciclasa convierte el ATP en AMPc. La otra ruta principal (*derecha*) no reconoce, que se sepa, señales inhibidoras externas. Utiliza una proteína estimuladora *G* para activar a su amplificador, la enzima fosfodiesterasa (PDE) que transforma el 4,5-difosfato fosfatidil-inositol en un par de segundos mensajeros: el diacil-glicerol (DG) y el trifosfato de inositol (IP_3). Por su parte, el IP_3 induce la movilización de otro mensajero: los iones calcio (Ca^{2+}). Es más, la ruta, de alguna manera, induce al amplificador guanilato ciclasa (GC) a convertir el GTP en el segundo mensajero guanosín monofosfato cíclico (GMPc). En general, el segundo mensajero se une al componente regulador de una proteína quinasa, enzima que activa respuestas celulares, así la contracción o la secreción, añadiendo grupos fosfato (PO_4) a ciertas proteínas. El calcio se une a una familia de proteínas que comprende la calmodulina (CaM) y la troponina C (TnC). La CaM activa una proteína quinasa y la TnC estimula directamente la contracción muscular.

gundos mensajeros conocidas, los mejor comprendidos hoy son los de transducción y amplificación que activa el AMP cíclico. Su dilucidación siguió diversas etapas, comenzando en 1958, cuando Earl W. Sutherland, Jr., y Theodore W. Rall, a la sazón en la Universidad Case Western Reserve, descubrieron el AMP cíclico. Posteriormente, en 1971, Martin Rodbell y sus colaboradores, en el Instituto Nacional de la Salud de los Estados Unidos, demostraron que el GTP resultaba esencial para el mecanismo de transducción que genera el AMP cíclico. Antes de que la información pueda atravesar la membrana, deben satisfacerse dos condiciones. En la superficie de la célula debe unirse a su receptor una señal externa, mientras que, en el interior de la célula, una molécula de GTP debe actuar sobre su proteína *G*.

La secuencia la han descrito en detalle Alfred G. Gilman y sus colaboradores, del Hospital Clínico de la Universidad de Texas en Dallas. Advirtieron la participación de dos tipos de proteínas *G*, una estimuladora y otra inhibidora. La proteína estimuladora, G_s, se une al receptor, denominado R_s. La unión de una señal externa con dicho receptor induce un cambio conformacional en este último. El cambio se transmite a través de la membrana celular a G_s, sensibilizándola al GTP, que procede del interior de la célula. La unión del GTP a G_s constituye, por tanto, la reacción de apertura: induce en G_s una nueva conformación, que a su vez le permite activar la adenilato ciclasa y, de ese modo, provocar la formación de AMP cíclico. La información transportada por la señal externa se ha transmitido así a través de la membrana y se ha asignado a una señal interna: un segundo mensajero.

La actividad del complejo G_s-GTP termina con la hidrólisis del GTP en GDP (guanosín difosfato), lo que constituye la reacción de cierre. La enzima GTPasa cataliza esa hidrólisis. Resulta ser que la actividad de la GTPasa se inhibe ante la toxina producida por el bacilo del cólera. La toxina prolonga la vida del complejo G_s-GTP, de modo que la célula produce AMP cíclico sin cesar, incluso en ausencia de una señal externa que induzca su producción. Cabe explicar así la fuerte diarrea característica de las víctimas del cólera: en las células del intestino, el AMP cíclico constituye un potente activador de la secreción de fluidos.

El otro tipo de proteína *G* de la ruta del AMP cíclico actúa de mediador en una transducción de tipo inhibidor. La llegada de una señal externa a los receptores R_i da lugar a una nueva conformación de la proteína *G*, llamada G_i (cambio dependiente, otra vez, de la unión de GTP); la proteína *G*, por su parte, inhibe la adenilato ciclasa. También aquí puede bloquear el flujo de información una toxina bacteriana, producida en este caso por *Bordetella pertussis*, el agente causante de la tosferina. La toxina de pertussis bloquea la inhibición de la adenilato ciclasa; sin embargo, se ignora si ese bloqueo da cuenta de cualquiera de los síntomas de la enfermedad. Las toxinas bacterianas han constituido valiosas herramientas experimentales para definir el papel de las proteínas *G*. Otro eficaz agente es el forscolín, molécula orgánica aislada de las raíces de la hierba india *Coleus forskohlii*. Extractos de esa planta se emplean todavía en la medicina tradicional de la India como remedios contra diversas dolencias: enfermedades cardiacas, trastornos respiratorios, insomnio y convulsiones. Estudios farmacológicos han establecido que el forscolín activa la adenilato ciclasa.

En los pasos químicos finales de la ruta del AMP cíclico interviene una quinasa *A*, que fosforila cierta proteína cuando la activa específicamente el AMP cíclico. Toda quinasa *A* consta de dos partes, una subunidad catalítica y otra reguladora. El AMP cíclico se une a la subunidad reguladora, liberando la catalítica, que queda libre para fosforilar proteínas. En las células adiposas, por ejemplo, la enzima lipasa inicia el goteo de las moléculas lipídicas (grasas) con alto contenido energético. Hormonas como la adrenalina se unen a receptores de la superficie celular; los receptores, que actúan a través de proteínas *G*, influyen sobre la adenilato ciclasa, que sintetiza AMP cíclico; el AMP cíclico estimula una quinasa *A* y ésta activa la lipasa, fosforilándola.

Se conocen otros ejemplos donde el AMP cíclico actúa valiéndose de la quinasa *A* para activar enzimas celulares (o procesos celulares, como el transporte iónico). Sin embargo, a medida que se han ido examinando en diversos tipos celulares los detalles moleculares de los pasos finales de la ruta del AMP cíclico, ha aparecido repetidamente un mismo modelo: el AMP cíclico parece actuar, por lo común, activando otro segundo mensajero, a saber, los iones calcio. Así, una de las dos rutas conocidas de transmisión de señales en las células actúa, fundamentalmente, modulando la otra. El corazón proporciona un ejemplo, hoy ya clásico, de ello. La adrenalina actúa a través de la ruta del AMP cíclico para modular los niveles intracelulares de calcio, con lo que la fuerza de cada latido está gobernada por un breve pulso de calcio. Hallazgos similares de modulación de la ruta del calcio por medio de la ruta del AMP cíclico se han obtenido en otras células musculares y en diversas células secretoras, incluidas las neuronas nerviosas.

La primera descripción del calcio en funciones de mensajero intracelular data de 1883, cuando el médico y fisiólogo inglés Sydney Ringer advirtió que fallaba la contracción del tejido muscular que examinaba si sustituía en su medio de cultivo el agua potable de Londres por agua destilada. Pronto se comprobó que el ingrediente que faltaba era el calcio. Una serie de observaciones demostró entonces que el calcio no sólo regulaba la contracción, sino también otros muchos procesos celulares. Constituye el segundo mensajero predominante en las células.

¿De dónde procede el calcio? En algunas células, como las neuronas, la fuente se conoce bien: el fluido extracelular. Las señales nerviosas que llegan a las terminaciones sinápticas de las neuronas rebajan la diferencia de potencial existente a través de la membrana celular de la neurona; la "despolarización" resultante abre los canales de calcio de la membrana sensibles a la diferencia de potencial. Antes de la despolarización, la concentración de calcio libre dentro de la neurona es aproximadamente 1×10^{-7} molar (valor que corresponde a alrededor de 6×10^{14} iones de calcio por centilitro de citoplasma). La concentración de calcio en el exterior de la neurona es cuatro órdenes de magnitud mayor. La despolarización permite a los iones de calcio fluir al interior de la neurona y desencadenar la respuesta celular. Incluso un cambio relativamente pequeño de la concentración intracelular de calcio ejerce profundas modificaciones sobre la actividad celular. Por ejemplo, en las terminaciones sinápticas de las neuronas, el calcio induce la liberación de moléculas neurotransmisoras.

Sin embargo, el fluido extracelular no puede ser la única fuente de iones de calcio. En primer lugar, la ausencia de calcio extracelular no evita que el mensajero externo, acetilcolina, estimule la liberación de la enzima digestiva amilasa por parte del páncreas. Se ha llegado lentamente a la conclusión de que el calcio empleado por la célula en la transmisión interna no sólo procede del exterior celular, sino que también se libera de depósitos internos. Se han descubierto muchos ejemplos de hormonas o neurotransmisores que emplean el calcio interno para controlar procesos fisiológicos. La señal externa consigue acceder al calcio interno estimulando la hidrólisis de una molécula lipídica que forma parte de la membrana plasmática.

En 1953, Mabel N. y Lowell E. Hokin, trabajando en el Hospital General de Montreal, observaron que la administración de acetilcolina a células secretoras del páncreas incrementaba la incorporación de grupos fosfato radiactivos (grupos PO_4 que contenían fósforo 32) a fosfatidil inositol (PI), que es uno de los fosfolípidos constituyentes de las membranas celulares. Al igual que otros lípidos de membrana, éste contiene una parte hidrófoba (dos cadenas de ácidos grasos unidos a glicerol) ligada a otra hidrófila, en este caso el "grupo de cabeza", el fosfato de inositol. Ciertos estimulantes, como la acetilcolina, provocan su escisión en esos dos componentes. El aumento de la incorporación de fósforo 32 observado por los Hokin era un proceso secundario, fruto de la posterior resíntesis de PI.

El punto clave de la cuestión era que se había encontrado una señal externa que estimulaba el ciclo de recambio (*turnover*) de un lípido de membrana. Los Hokin propusieron que el incremento del ciclo de recambio guardaba relación con el mecanismo de exocitosis por el cual las células del páncreas liberan enzimas digestivas. Estudios posteriores establecieron una conclusión más amplia: ese incremento se producía en respuesta a muchos estímulos, y no necesariamente a los que activan la secreción. Se extendió entonces la impresión de que el ciclo de recambio de los lípidos de membrana debía desempeñar un papel más general en la vida de las células.

En 1975, Robert Michell, de la Universidad de Birmingham, postuló ese papel. Advirtiendo una fuerte correlación entre la capacidad de una señal externa para estimular el recambio inositol-lípido y la movilización de calcio dentro de la célula, propuso que la alteración del ciclo de recambio del lípido desencadenado por señales externas era la responsable de la producción de señales internas de calcio. Michell y sus colaboradores añadieron a ello otra sugerencia. Las membranas celulares contienen tres lípidos de inositol, pero solamente uno de ellos, el 4,5-difosfato fosfatidil-inositol, PIP_2, relativamente

menor, parecía cambiar (en concreto, se hidrolizaba) en relación al mecanismo de movilización del calcio.

¿Cómo puede la hidrólisis de un lípido de membrana aumentar la concentración intracelular de calcio? Ha costado casi una década descubrir los detalles del proceso. Para comprender cómo los segundos mensajeros abandonan la membrana celular y cuál pudiera ser su funcionamiento habrá que revisar algunos aspectos básicos de la bioquímica de las moléculas que componen las membranas celulares. Situados en un medio acuoso, los fosfolípidos, de los cuales los lípidos de inositol son notables ejemplos, coalescen espontáneamente en una doble capa alineada que constituye la estructura básica de toda membrana biológica. La interpretación tradicional es que la bicapa lipídica funciona a modo de barrera inerte y permeable, razón por la cual se ha subvalorado a menudo a los fosfolípidos, atribuyéndoles un papel fundamentalmente pasivo en la vida de la célula. El papel desempeñado por los fosfolípidos de membrana en la ruta de la transmisión intracelular constituyó, por tanto, una sorpresa.

El fosfatidil-inositol es un fosfolípido típico, situado principalmente en la hoja interior de la bicapa. Lo que más destaca en él es su conversión en PIP_2, un fosfolípido poco común que presenta tres grupos fosfato en lugar de uno solo, como ocurre en los demás lípidos de membrana. Los fosfatos adicionales, derivados del ATP, se añaden secuencial y específicamente a los carbonos que ocupan las posiciones 4 y 5 del anillo de seis carbonos del inositol.

El PIP_2 es el lípido de inositol que interesaba a Michell. En respuesta a señales externas se hidroliza en diacil-glicerol y trifosfato de inositol, IP_3. Dos grupos de investigadores, Richard Haslam y Monica Davidson, de la Universidad de MacMaster en Ontario, y Shamshad Cockcroft y Bastion D. Gomperts, del University College de Londres, han descubierto que el GTP constituye una parte necesaria de la secuencia. Por tanto, de nuevo parece que la proteína *G* acopla receptores de superficie con un amplificador (en este caso la enzima fosfolipasa *C*). En última instancia, el diacil-glicerol y el IP_3 se reciclan: el primero por medio de una serie de reacciones que componen el llamado ciclo lipídico y, el segundo, siguiendo el denominado ciclo del inositol fosfato. Ambos ciclos se combinan para reconstruir el fosfatidil-inositol.

El paso final del ciclo del inositol fosfato resulta particularmente intere-

3. ESTRUCTURA QUIMICA de tres segundos mensajeros: AMP cíclico (también mostrado en la figura 1), DG e IP_3. El AMPc (*arriba*) se sintetiza en una reacción que arranca dos de los tres grupos fosfato del ATP. Por su lado, DG e IP_3 (*abajo*) se sintetizan a partir del PIP_2 mediante una reacción simple: en la molécula precursora, un fosfolípido que se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, se desprende la "cabeza", cargada negativamente, del esqueleto de glicerol que transporta las dos "colas" de ácidos grasos.

sante; se trata de la conversión del inositol monofosfato (IP_1) en inositol libre por medio de la enzima inositol 1-monofosfatasa. Trabajando en San Luis, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Washington, James Allison y William R. Sherman han demostrado que la acción de la enzima queda inhibida por los iones litio. La administración de litio puede, por tanto, disminuir la velocidad de resíntesis del fosfatidil-inositol, debilitando la efectividad de cualquier mecanismo neuronal que dependa de lípidos de inositol para transportar las señales. Quizás ello explique la eficacia de los iones litio para controlar las enfermedades mentales maníaco-depresivas.

El IP_3 atrajo por primera vez mi atención al medir la velocidad de formación de los fosfatos de inositol en las glándulas salivares de las moscas, en respuesta a la hormona serotonina. El análisis de los metabolitos solubles en agua extraídos de la glándula revelaron la presencia de al menos cuatro sustancias distintas. Una era inositol libre; las otras resultaron ser fosfatos de inositol IP_1, IP_2 e IP_3. Los análisis se realizaron en colaboración con Robin Irvine y Rex Dawson, del Instituto de Fisiología Animal del Consejo de Investigación Agrícola en Babraham, y Peter Downes, de la Unidad de Farmacología Neuroquímica del Consejo de Investigación Médica de Cambridge. En 1964, Dawson, que había estudiado la enzima que hidroliza el PIP_2, almacenó uno de los productos de la reacción, el IP_3, congelándolo a muy baja temperatura. Casi dos décadas después, se empleó como patrón para verificar la identificación del metabolito en glándula de mosca.

Comparando el ritmo de formación del IP_3 con el de irrupción de las señales fisiológicas que acompañan la secreción de fluido por las células de la glándula salivar del insecto, John P. Heslop y el autor demostraron que la administración de serotonina induce la formación de IP_3 a un ritmo lo suficientemente elevado para que éste pueda actuar de segundo mensajero: movilizaría el calcio, el cual, a su vez, impulsaría la secreción de saliva. En la búsqueda de pruebas directas de tal función, enviamos una muestra de IP_3, que Irvine había preparado a partir de glóbulos rojos, al Instituto Max Planck de Frankfurt, donde Hanspeter Streb e Irene Schulz advirtieron que, al aplicar la muestra a células de páncreas de rata, provocaba una elevada liberación de calcio (las células se permeabilizaron primero para que el IP_3 aplicado por los investigadores accediera a su interior).

Esta primera demostración de la liberación de calcio inducida por IP_3 ha sido ya confirmada en numerosos tipos celulares diferentes. Gillian Burgess y James W. Putney, Jr., de la Facultad de Medicina de Virginia, y John R. Williamson, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Pennsylvania, han demostrado, por ejemplo, que el IP_3 moviliza el calcio acumulado por el mecanismo hormonal de liberación de glucosa del hígado. Más aún, Yoram Oron y sus colaboradores, de la Universidad de Tel-Aviv, han comprobado que la corriente de iones cloruro inducida por acetilcolina en ovocitos inmaduros de la rana *Xenopus* puede duplicarse inyectando a las células IP_3. Además, el IP_3 provoca muchos de los primeros procesos de la fecundación. Por ejemplo, los gránulos acumulados justo debajo de la superficie del huevo suelen segregarse a los pocos minutos de la fecundación para formar la gruesa capa protectora denominada membrana de fecundación. La secreción, dependiente del calcio, puede desencadenarse inyectando IP_3 en los huevos. En todos los casos el IP_3 actúa, predominantemente, liberando calcio encerrado en el retículo endoplásmico de las células (membrana interna que forma un sistema de cavernas dentro de la célula). Por su parte, el calcio desencadena la respuesta celular.

El descubrimiento del segundo mensajero IP_3 ha llevado a especular sobre si éste puede funcionar como tal segundo mensajero en el músculo esquelético. En el músculo, la despolarización de las envueltas de la membrana celular, conocidas como túbulos transversos, desencadenan de alguna manera la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, una estructura análoga al retículo endoplásmico de las células no musculares. El calcio dispara la contracción muscular. Roger Y. Tsien y Julio Vergara, de la Universidad de California en Berkeley, y Tullio Pozzan y sus colegas, de la Universidad de Padua, han observado que las fibras musculares aisladas se contraen en respuesta a la administración de IP_3. Trátase, pues, de que, en el músculo, el IP_3 constituye el engarce entre la despolarización y el calcio. Confirmar esta suposición constituiría el más precioso tesoro de la hipótesis del IP_3, el problema de cómo se generan las señales de calcio en el músculo esquelético ha intrigado a los fisiólogos durante décadas.

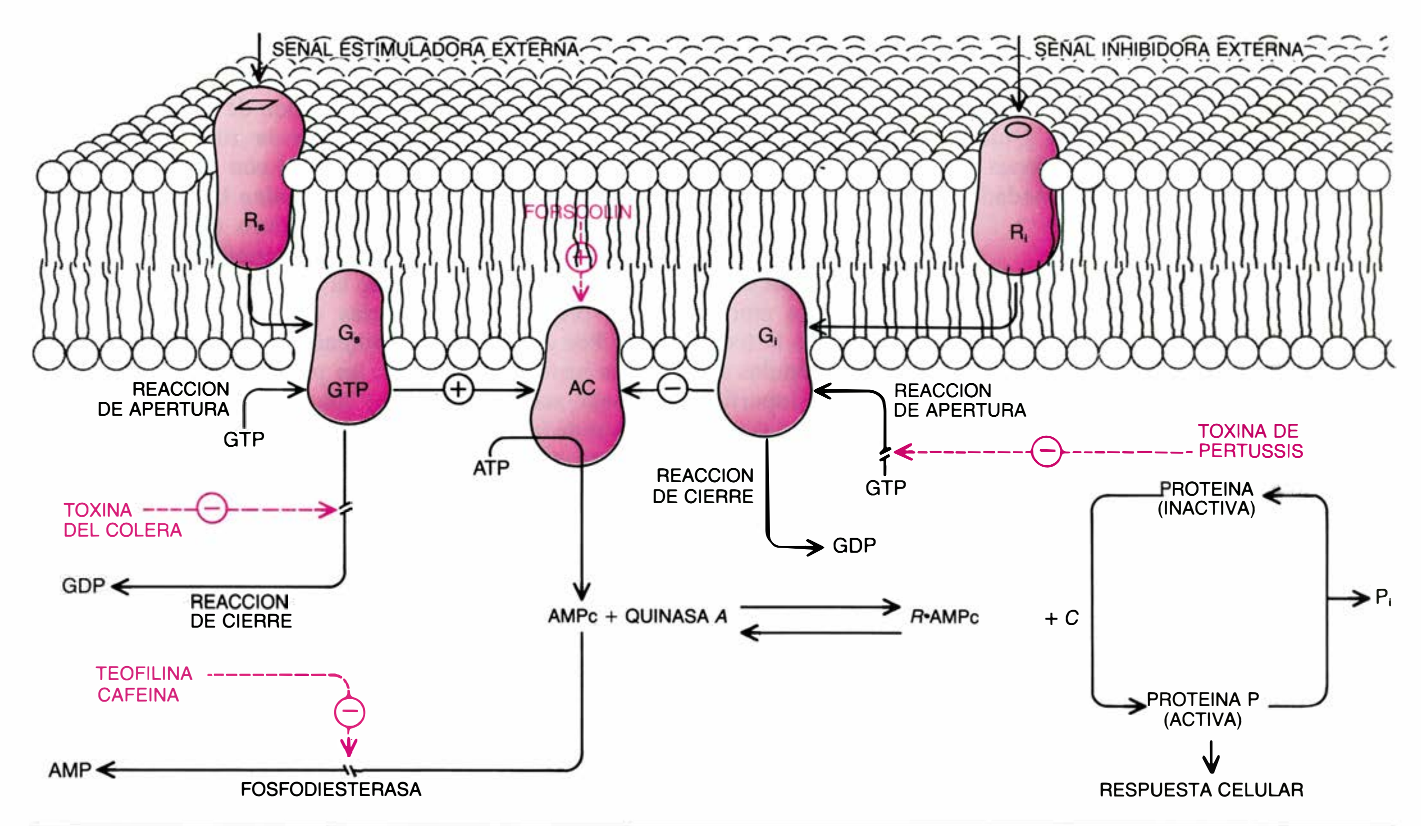
Una razón más de que el crecimiento de transducción lípido-inositol atraiga tanto interés es que la ruta de transmisión se bifurca. Un producto de la hidrólisis del lípido de inositol (PIP_2) es el IP_3, cuyo papel señalé antes. El otro producto, el diacil-glicerol, permanece en la membrana y, sin embargo, aparentemente funciona, al igual que el IP_3, como segundo mensajero. Yasutomi Nishizuka y sus colaboradores, de la Universidad de Kyoto, proponen que activa a una proteína quinasa unida a la membrana, que han denominado quinasa *C*.

La contribución de cada rama que se bifurca de la ruta lípido-inositol puede valorarse con agentes farmacológicos que simulen la acción de algún segundo mensajero en particular, de modo que se estimule sólo una de las ramas de la ruta. Los ésteres de forbol (sustancias que se encuentran en el aceite obtenido de la semilla de *Croton tiglium*, un pequeño árbol del sudeste asiático) simulan la acción del diacil-glicerol actuando directamente sobre la quinasa *C*. (Los ésteres de forbol provocan inflamación de la piel y son potentes agentes inductores de tumores cuando se aplican a animales de experimentación en combinación con un carcinógeno.) Por el contrario, los ionóforos de calcio (moléculas que envuelven la carga eléctrica de un ion calcio y permiten su paso a través de la membrana celular) simulan la acción del IP_3 introduciendo calcio libre en la célula. Se ha comprobado experimentalmente que las dos ramas son sinérgicas: en plaquetas, por ejemplo, Nishizuka ha advertido que la combinación del éster de forbol y del calcio ionóforo induce la secreción máxima de serotonina en dosis para las cuales cada sustancia, administrada por separado, no ejercía efecto alguno.

Difícilmente cabe exagerar la importancia global de la ruta de transmisión por dos ramas: puede desencadenarse gran número de fenómenos celulares por la administración combinada del éster del forbol e ionóforos de calcio. Quizás el descubrimiento más notable sea que pueden iniciar la síntesis de ADN; descubrimiento notable porque sugiere que las rutas de transmisión, responsables de actividades celulares rutinarias tales como la secreción y la contracción, pueden también regular el crecimiento. La acción de los ésteres de forbol como agentes causantes de tumores probablemente se base, por ejemplo, en su capacidad de amplificar la rama DG/quinasa *C*, de la ruta de transmisión lípido-inositol. De hecho, plantea la posibilidad de que las alteraciones de la ruta de transmisión intracelular sean una de las causas del

cáncer, por interrupción de la regulación normal del crecimiento celular.

Las células crecen a medida que avanzan por los estadios del ciclo celular. En una fase inicial aumentan de tamaño; se trata de la primera fase de crecimiento, G_1. Después, replican todos sus cromosomas (durante el período S, de síntesis de ADN) y se preparan para la división celular (durante G_2, la segunda fase de crecimiento). Finalmente, se dividen (en la M, mitosis). Justo después de la división se llega a una bifurcación. Toda célula hija producto de la división puede volver a entrar en ciclo, y dividirse de nuevo, o entrar en la fase G_0, durante la cual se diferencia hasta adquirir la capacidad para desempeñar la tarea especializada que le corresponda en alguno de los tejidos del cuerpo. En algunos tipos celulares, como las neuronas, la diferenciación pone fin a la división; en otros, la célula puede volver

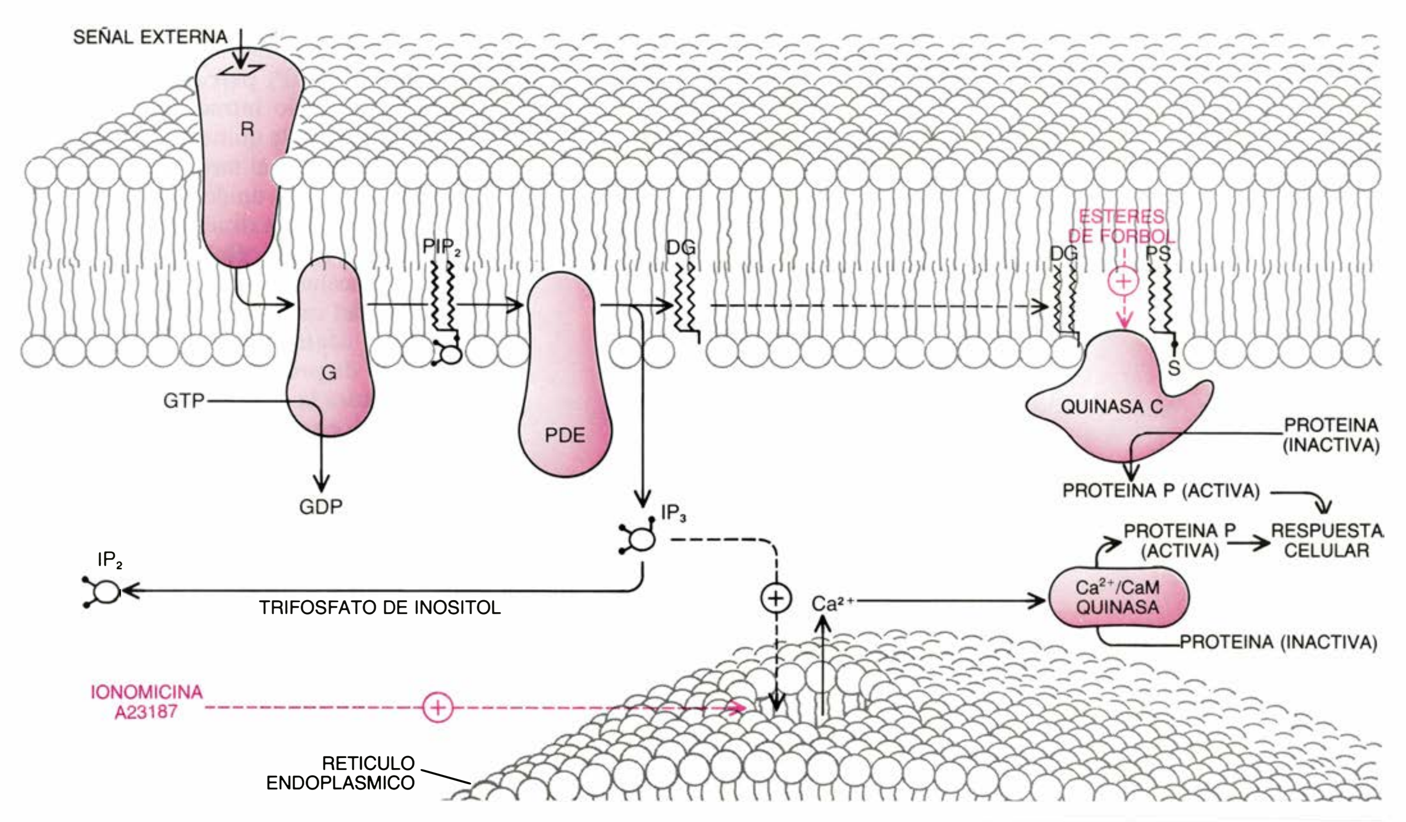


SEÑALES EXTERNAS ESTIMULADORAS	SEÑALES EXTERNAS INHIBIDORAS	TEJIDO	RESPUESTA CELULAR
ADRENALINA (RECEPTORES BETA)		MUSCULO ESQUELETICO	DEGRADACION DEL GLUCOGENO*
ADRENALINA (RECEPTORES BETA)		CELULAS ADIPOSAS	AUMENTO DE LA DEGRADACION DE LIPIDOS
ADRENALINA (RECEPTORES BETA)		CORAZON	AUMENTO DEL RITMO Y FUERZA DE LA CONTRACCION CARDIACA*
ADRENALINA (RECEPTORES BETA)		INTESTINO	SECRECION DE FLUIDOS*
ADRENALINA (RECEPTORES BETA)		MUSCULO LISO	RELAJACION*
HORMONA ESTIMULANTE DEL TIROIDES		GLANDULA TIROIDES	SECRECION DE TIROXINA
VASOPRESINA (RECEPTORES V_2)		RIÑON	REABSORCION DE AGUA
GLUCAGON		HIGADO	DEGRADACION DE GLUCOGENO*
SEROTONINA		GLANDULA SALIVAR (MOSCARDA)	SECRECION DE FLUIDOS
PROSTAGLANDINA I_1		PLAQUETAS	INHIBICION DE LA AGREGACION Y LA SECRECION*
	ADRENALINA (RECEPTORES $ALFA_2$)	PLAQUETAS	ESTIMULACION DE LA AGREGACION Y LA SECRECION*
	ADRENALINA (RECEPTORES $ALFA_2$)	CELULAS ADIPOSAS	DISMINUCION DE LA DEGRADACION DE LIPIDOS
	ADENOSINA	CELULAS ADIPOSAS	DISMINUCION DE LA DEGRADACION DE LIPIDOS

4. DETALLES DE LAS RUTAS DE TRANSMISION. En la ruta del AMPc (*izquierda*), las señales procedentes de los receptores estimuladores (R_s) y de los receptores inhibidores (R_i) convergen en la enzima amplificadora adenilato ciclasa (AC), que convierte ATP en AMPc. Las proteínas *G*, que gobiernan dicha convergencia, las activa el GTP (*reacción de apertura*) y se paralizan cuando el GTP se hidroliza a GDP (reacción de cierre). Por su parte, el AMPc se une al componente regulador (R) de su proteína quinasa, liberando el componente catalítico (C) para que fosforile ciertas proteínas que regulan la respuesta celular. Se muestran en color los fármacos que afectan a diversas etapas de la secuencia. Algunas de las respuestas celulares conocidas se enumeran en la tabla adjunta. En muchos casos (*asteriscos*), el AMPc modula la actividad de otro segundo mensajero, el calcio, que por su lado gobierna la respuesta. En la ruta del lípido-

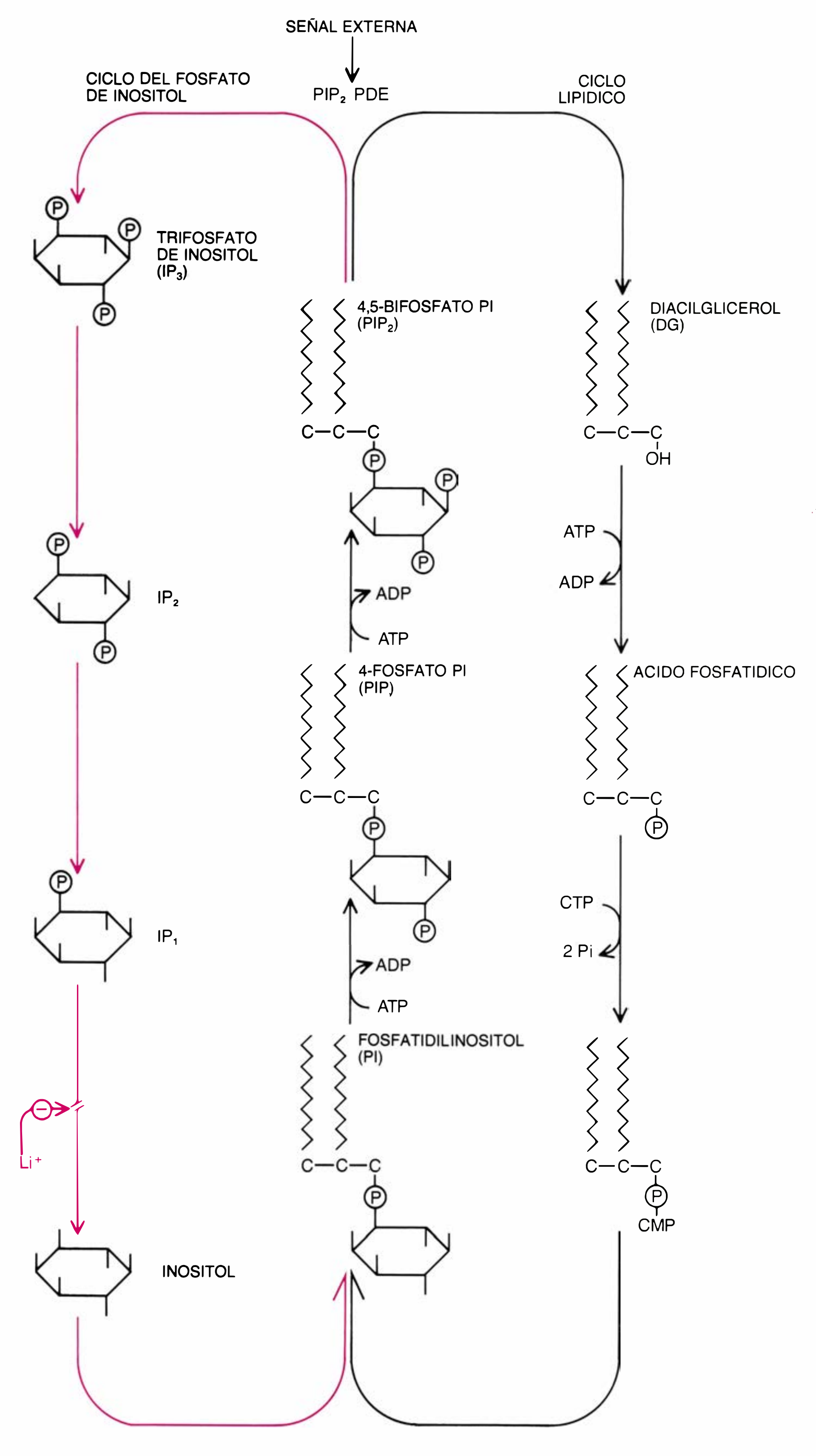
al ciclo celular para engendrar nuevos descendientes. En el último caso, el regreso al ciclo celular viene determinado por la acción de factores de crecimiento: sustancias liberadas por un grupo de células que estimulan el crecimiento de otras.

Sigue ignorándose en gran medida el modo exacto de actuación de esos factores de crecimiento. No cabe duda, sin embargo, de que deben instar el envío de señales desde la superficie de la célula (donde los factores actúan uniéndose a los receptores) hacia el núcleo (donde se replica el ADN). Consideraré dos posibles rutas. Una de ellas no se conoce bien aún. Empleada por factores de crecimiento del tipo de la insulina y el factor de crecimiento epidérmico (EGF), parece contar con receptores que activan la enzima tirosinasa quinasa. La ruta quizá sea, en esencia, una cascada apoyada en la fosforilación de una serie de proteínas.



SEÑAL EXTERNA	TEJIDO	RESPUESTA CELULAR
VASOPRESINA	HIGADO	DEGRADACION DEL GLUCOGENO
ACETILCOLINA	PANCREAS	SECRECION DE AMILASA
ACETILCOLINA	MUSCULATURA LISA	CONTRACCION
ACETILCOLINA	OVOCITOS (*XENOPUS*)	PERMEABILIDAD AL CLORURO
ACETILCOLINA	CELULAS PANCREATICAS BETA	SECRECION DE INSULINA
SEROTONINA	GLANDULA SALIVAR (MOSCARDA)	SECRECION DE FLUIDO
TROMBINA	PLAQUETAS	AGREGACION PLAQUETARIA
ANTIGENO	LINFOCITOS	SINTESIS DE ADN
ANTIGENO	HISTAMINOCITOS	SECRECION DE HISTAMINAS
FACTORES DE CRECIMIENTO	FIBROBLASTOS	SINTESIS DE ADN
LUZ	FOTORRECEPTORES (*LIMULUS*)	FOTOTRANSDUCCION
ESPERMATOZOO	HUEVOS DE ERIZO DE MAR	FECUNDACION
HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA	LOBULO ANTERIOR DE LA GLANDULA PITUITARIA	SECRECION DE PROLACTINA

inositol (*derecha*), las señales externas se unen a receptores (R) que transmiten la información a través de una proteína *G* (G), la cual activa la fosfodiesterasa PIP_2 (PDE). A su vez, el PDE rompe el PIP_2 en los segundos mensajeros trifosfato de inositol (IP_3) y diacil-glicerol (DG). El IP_3 es soluble en agua, por lo que se difunde en el interior del citoplasma, donde libera calcio almacenado en las cavernas membranosas intracelulares llamadas retículo endoplásmico. Por su parte, el calcio estimula una proteína quinasa. DG permanece en la membrana, donde activa la enzima quinasa *C*; el fosfolípido de membrana fosfatidil serina (PS) es un cofactor, porción independiente necesaria de la activación. Las dos ramas de la ruta conducen a la fosforilación de distintos grupos de proteínas. Las ramas pueden activarse por medio de los fármacos. La tabla adjunta enumera algunas de las respuestas celulares en las que interviene la ruta respectiva.



5. CICLOS LIPIDO-INOSITOL que completan el abastecimiento de segundos mensajeros formados por lípidos de inositol. Las señales externas actúan a través de la enzima fosfodiesterasa PIP_2, que escinde el PIP_2 en dos mensajeros: DG y IP_3. Atraviesan entonces ambos una secuencia de reacciones químicas que los prepara para volver a unirse, formándose fosfatidil-inositol (PI) y, finalmente, reconstruyéndose el PIP_2. Los ciclos requieren la presencia continua de ATP y de citosín trifosfato (CTP), fuente de grupos fosfato (P_i). Entre los pocos fármacos conocidos que afecten a parte de esta ruta destaca el litio (*color*): bloquea la conversión de IP_1 en inositol libre, que se requiere para la síntesis de PI. Quizás interfiera el litio en las rutas de transmisión utilizando los mensajeros derivados de los lípidos de inositol. (Dibujos de Andrew Christie.)

La otra ruta de transmisión, empleada por factores tales como los del crecimiento derivados de plaquetas (PDGF), parece ser idéntica a la empleada por hormonas y neurotransmisores. Los PDGF que llegan a la superficie de la célula estimulan la hidrólisis del PIP_2 en los segundos mensajeros IP_3 y diacil-glicerol, que participarían en los procesos que componen la fase de crecimiento G_1 y prepararían a la célula para la síntesis de ADN. En concreto, el IP_3 parece actuar movilizando el calcio intracelular; el diacilglicerol activa la quinasa *C*, la cual, por su parte, activa el mecanismo de intercambio de iones unidos a la membrana. El mecanismo extrae protones (iones hidrógeno) de la célula, aumentando el *p*H intracelular. Según parece, la activación del calcio y el aumento del *p*H, juntos, contribuyen a la síntesis de ARN y de proteínas que preparan a la célula para la síntesis de ADN.

Puesto que cada ruta de transmisión está constituida por una secuencia de reacciones controladas por proteínas específicas, receptores y enzimas, el material genético de la célula debe contener genes responsables de la síntesis de las proteínas requeridas en las rutas. Cualquier aberración de las funciones de tales genes puede provocar, por tanto, anomalías en el crecimiento celular y, verosímilmente, conducir a un crecimiento incontrolado y a las transformaciones estructurales típicas del cáncer. Se han identificado ya alrededor de 25 genes cuya disfunción guarda relación con la frecuencia del cáncer. Se agrupan bajo la denominación colectiva de oncogenes. Hasta ahora resultaba algo oscura la función normal que corresponde a cada uno de ellos; parece que algunos codifican la estructura de varios componentes de la ruta de transmisión que controla el crecimiento celular.

La primera correlación entre oncogenes y componentes de la ruta de transmisión intracelular la establecieron simultáneamente dos grupos de investigadores; uno encabezado por Russell F. Doolittle, de la Universidad de California en San Diego, y otro por Michael Waterfield, de los Laboratorios de la Fundación Imperial para la Investigación del Cáncer, de Londres. Descubrieron que el oncogén llamado *sis* controlaba la síntesis de los factores de crecimiento derivados de plaquetas. Descubrimientos de similar importancia siguieron en otros laboratorios. El gen *erb b* resultó codificar la estructura de una proteína casi idéntica al recep-

tor del factor de crecimiento epidérmico. El receptor tiene tres partes principales: una parte externa, expuesta a la superficie celular, que contiene el dominio de unión del EGF; una parte media, que cruza la membrana celular, y otra interna, expuesta al citoplasma celular, que expresa la actividad protein-fosforilante de la tirosina quinasa. El producto del gen *erb b* constituye una versión truncada del receptor, aquella que carece de la parte externa de la proteína. Posiblemente esa versión truncada emita señales hacia el interior celular incluso en ausencia de EGF.

El oncogén *ras* también sigue ese modelo. Se sabe que es activo en muchos tipos de células cancerosas. No se conoce todavía su función, pero su producto presenta las características de una proteína *G*: es un constituyente de la membrana celular y se une a GTP. Cabe la posiblidad de que intervenga entre los receptores de factores de crecimiento y amplificadores de señales, como la enzima fosfodiesterasa, que escinde el PIP_2 en dos segundos mensajeros: IP_3 y diacil-glicerol. Los oncogenes *src* y *ros* parecen participar en la conversión del fosfatidil-inositol en PIP_2, esto es, parecen regular las enzimas que reponen el precursor de los segundos mensajeros lípido-inositol. Otros dos oncogenes, el *myc* y el *fos*, operan, aparentemente, en el otro extremo de la cascada de la transmisión intracelular. Philip Leder y sus colaboradores, en la Facultad de Medicina de Harvard, han observado que la abundancia de ARN mensajero transcrito a partir del oncogén *myc* aumenta considerablemente al cabo de una hora de tratamiento de fibroblastos (células inmaduras del tejido conectivo) con PDGF. Los resultados de la transcripción del oncogén *fos* aparecen incluso antes. Los genes *myc* y *fos* especifican la estructura de proteínas encontradas en el núcleo, de lo que parece deducirse que toman parte en la secuencia de procesos que inician la síntesis de ADN.

Empieza a vislumbrarse una red integrada de productos oncogénicos responsables del transporte de información entre la superficie celular y el núcleo. Algunos oncogenes (*sis*) especifican factores de crecimiento, los cuales actúan induciendo a otros oncogenes (*myc* y *fos*) a producir sustancias activas en el núcleo. La distorsión de tales secuencias conduce al crecimiento celular incontrolado y al cáncer.

En todo lo anterior he descuidado mencionar otro candidato a segundo mensajero, el GMP cíclico, que se distingue estructuralmente del AMP cíclico en que la guanosina toma el lugar de la adenosina. Aunque el GMP cíclico tiene el sello de segundo mensajero, no se conoce bien cuál sea su papel exacto en las células. En primer lugar, la guanilato ciclasa, la enzima que sintetiza GMP cíclico a partir de GTP, no suele encontrarse conectada a un receptor. Sin embargo, la formación de GMP cíclico se produce, a menudo, junto con la activación de la ruta lípido-inositol. Aparentemente, alguna molécula creada por la hidrólisis de lípidos de inositol provoca la formación del GMP cíclico. El final de la ruta de transmisión presenta sombras parecidas. Se sabe que el GMP cíclico activa una proteína quinasa (en concreto, la llamada quinasa *G*); ésta, por su parte, fosforila algunas proteínas, cuyas funciones se ignoran.

El GMP cíclico ejerce, además, efectos sorprendentes, demostrados especialmente en el sistema nervioso. Por ejemplo, James W. Truman, de la Universidad de Washington, ha descubierto la participación del GMP cíclico en el control de un complejo modelo de comportamiento de los insectos. Al final de la metamorfosis, las polillas abandonan sus capullos siguiendo un modelo cuidadosamente orquestado de movimientos serpenteantes y de retorcimiento desencadenados por una eclosión de hormonas liberadas por el cerebro. Este modelo de comportamiento preprogramado se inicia con un aumento de los niveles de GMP cíclico, que se produce cuando la eclosión hormonal actúa sobre el sistema nervioso.

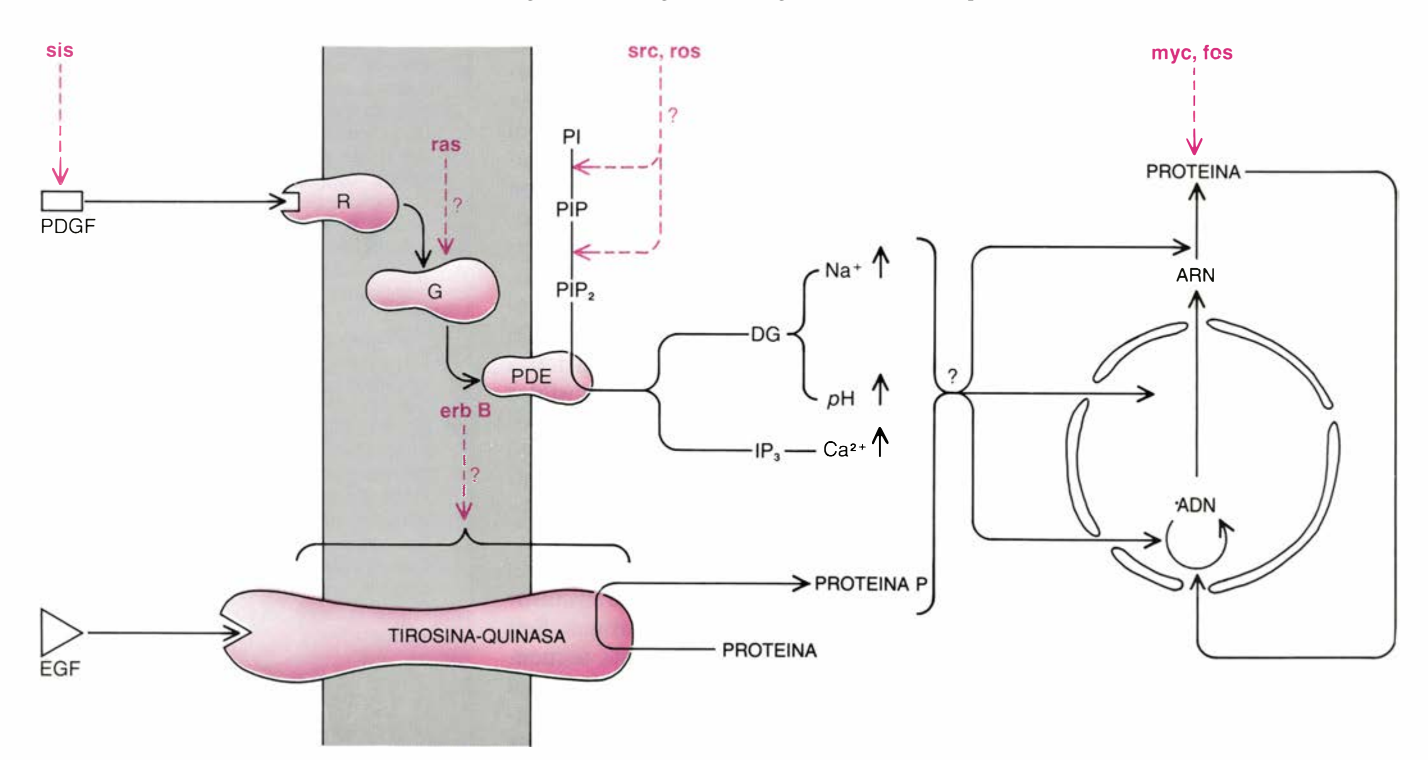
También en la retina se ha descubierto la actuación del GMP cíclico. En concreto, desempeña ciertas funciones en los fotorreceptores (células sensibles a la luz) de los vertebrados, en los denominados bastoncillos. Un bastoncillo es un transductor sensorial situado entre el mundo visual y el cerebro. Se trata de una célula alargada. Por un extremo recibe fotones, o cuantos de luz; por el otro, libera un neurotransmisor que envía señales a las neuronas. Son notables dos aspectos de esta secuencia. En primer lugar, la cantidad del transmisor liberado por la célula es mayor en ausencia de luz. Ello sugiere que los bastoncillos poseen una curiosa cualidad: en respuesta a señales externas (en este caso fotones), el mensajero interno debe disminuir su actividad. En segundo lugar, el receptor de los bastoncillos, la molécula llamada rodopsina, se encuentra en un complicado

apilamiento de discos de membrana del interior celular. Por otro lado, la liberación del neurotransmisor se regula a través de cambios de la permeabilidad de la membrana plasmática a los iones sodio. Lo cual plantea el problema central en la fototransducción: ¿Cuál es la identidad del segundo mensajero que lleva información desde el disco interno hacia la membrana plasmática?

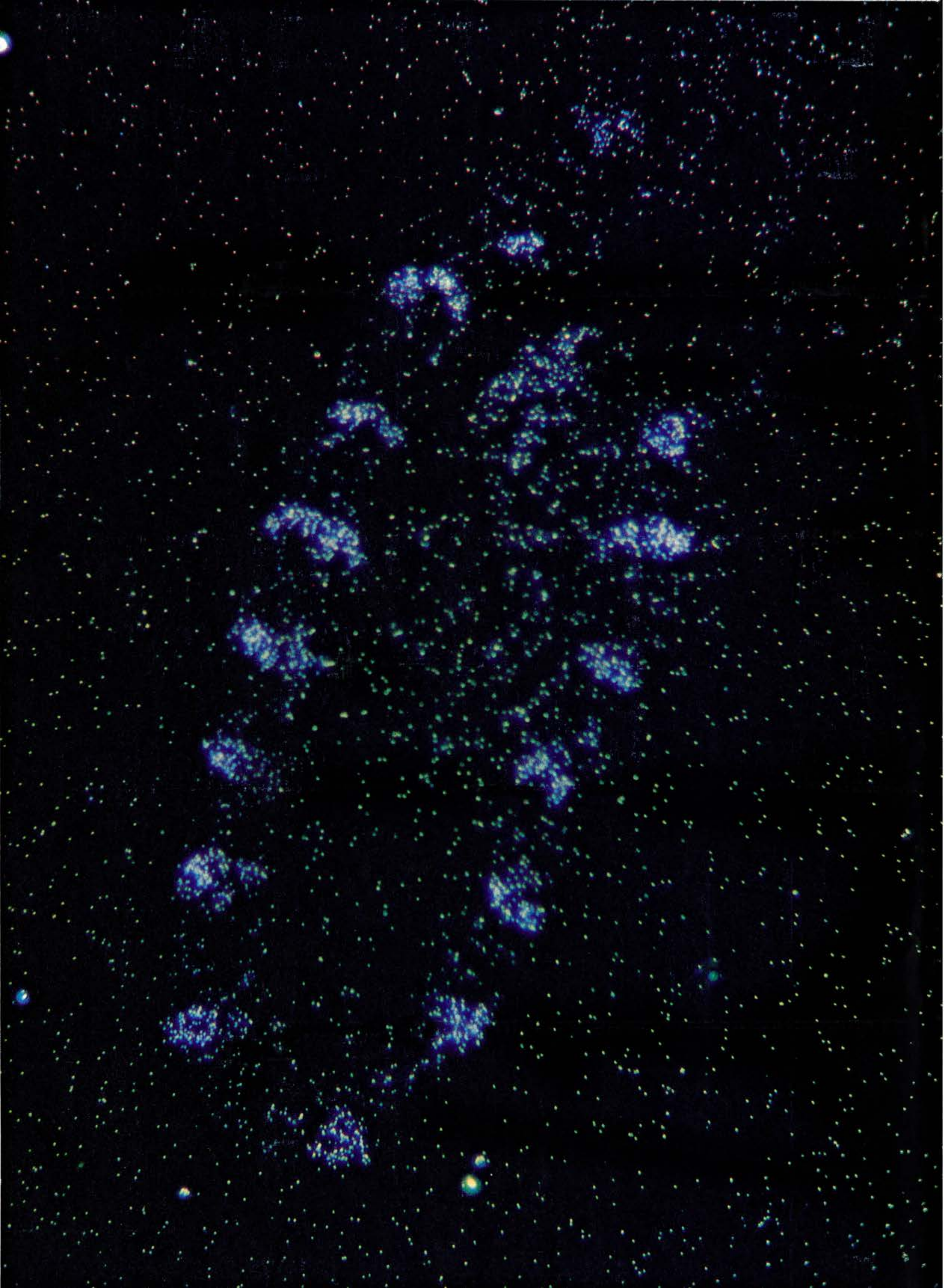
Durante algún tiempo, dos grupos de investigadores han mantenido puntos de vista opuestos a propósito de la identidad del mensajero. Un grupo eligió como candidato al calcio; el otro, al GMP cíclico. La verdad probablemente se halle en medio: parece que intervienen ambos. Me referiré aquí a lo que atañe al GMP cíclico. La hipótesis actual es que los canales de sodio que atraviesan la membrana plasmática de los bastoncillos se mantienen abiertos en la oscuridad debido a la existencia de altos niveles intracelulares de GMP cíclico. Evgenii Fesenko y sus colaboradores, del Instituto de Biofísica de Moscú, han presentado un sorprendente aspecto de esta hipótesis. Parece que el GMP cíclico abre el canal directamente, es decir, sin activar una proteína quinasa. Al incidir los fotones, la rodopsina, que los absorbe, induce a una molécula llamada transduccina (otro miembro de la familia de las proteínas *G*), a unirse a GTP y a activar la enzima fosfodiesterasa GMP cíclica. La consecuencia de ello es una estrepitosa caída de los niveles de GMP cíclico y el cierre de los canales de sodio. Debe señalarse, sin embargo, que en los fotorreceptores del cangrejo *Limulus* el efecto de la luz puede remedarse inyectando IP_3, aunque no así con GMP cíclico. Quizás el segundo mensajero de la transducción de la señal visual varíe entre unas especies y otras.

El interés por el GMP cíclico crecerá, probablemente, a raíz del descubrimiento, por parte de Ferid Murad, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, de que el factor natriurético de la aurícula (hormona descubierta recientemente, secretada por la aurícula del corazón y que parece relajar los músculos lisos que rodean los vasos sanguíneos) interviene en la regulación de la presión sanguínea incrementando los niveles de GMP cíclico. Al igual que el AMP cíclico, el GMP cíclico quizás actúe modulando la acción del calcio.

¿Se han identificado ya todas las rutas de transmisión de segundos mensajeros? La respuesta es, casi con seguridad, negativa. Algunas señales externas inducen efectos profundos en la célula por medio de rutas de transmisión que se desconocen por completo. Ejemplo de ello es la maduración de los ovocitos de la estrella de mar. La administración de 1-metiladenina (hormona de maduración liberada por las células que rodean el folículo) a la superficie de los ovocitos produce la disolución del núcleo y la reiniciación de la meiosis, el proceso de división celular por medio del cual se multiplican las células sexuales. No se entiende que una sustancia tan simple como la 1-metiladenina, al actuar sobre la superficie celular, determine la desaparición del núcleo. La insulina nos ofrece otro ejemplo. También resulta oscura la ruta por medio de la cual conduce la síntesis de lípidos y glucógeno en las células musculares y hepáticas. Joseph Larner y sus colaboradores, de la Universidad de Virginia, han propuesto que la insulina quizás actúe a través de un péptido, pero las pruebas son aún muy incompletas. Lo único que parece seguro es que el receptor de la insulina, al igual que el receptor del factor de crecimiento epidérmico, actúa como una tirosina quinasa. Se han desentrañado algunas rutas de transmisión intracelular, pero quedan otras por conocer.



6. REGULACION DEL CRECIMIENTO CELULAR, que constituye, presumiblemente, una función de las rutas de los segundos mensajeros. El problema central al que debe darse explicación es cómo las señales externas, llamadas factores de crecimiento, que actúan en los receptores de la superficie celular (*izquierda*), logran dar instrucciones a la maquinaria del núcleo (*derecha*) para que comience la compleja secuencia de fenómenos que culminan en la síntesis de ADN. Algunos factores de crecimiento, entre los que se cuenta el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), parece que utilizan la ruta convencional lípido-inositol: el IP_3 moviliza el calcio, mientras que el DG activa la bomba de la membrana que intercambia protones por iones sodio. Lo que aumenta el *p*H intracelular y la concentración de iones sodio. Cada cambio podría transportar información al núcleo. Otros factores de crecimiento, entre ellos los factores de crecimiento epidérmico (EGF), parece que emplean una ruta diferente. El receptor EGF, que atraviesa de un lado a otro la membrana plasmática, contiene una parte interna que fosforila proteínas (muestra actividad tirosina quinasa). Varios oncogenes (genes cuyo incorrecto funcionamiento guarda relación con el cáncer) quizás actúen (*color*) desorganizando las rutas que controlan el crecimiento. El oncogén *erb B* determina una proteína idéntica a parte del receptor EGF. Muchos otros oncogenes parece que afectan a la ruta lípido-inositol. Los interrogantes señalan las posibilidades menos comprobadas.



Base molecular del desarrollo

¿Cómo se establece la arquitectura básica de un embrión? El descubrimiento de un corto segmento de ADN, la llamada caja homeótica, puede suministrar una parte crucial de la respuesta para un número bastante extenso de especies

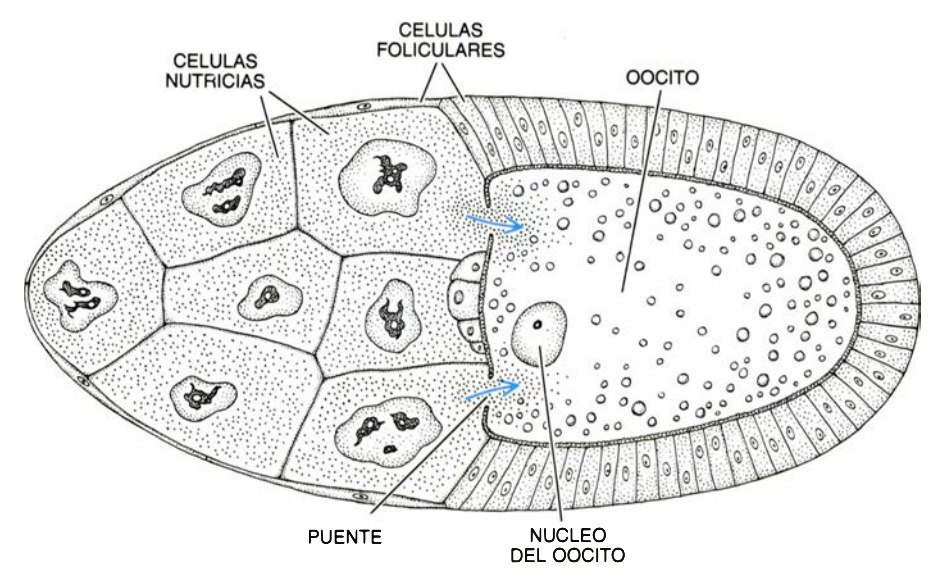
Walter J. Gehring

Uno de los grandes misterios de la biología es el modo en que la información lineal contenida en el ADN genera un organismo tridimensional específico, en el curso de su desarrollo a partir del huevo fecundado. Cada órgano del animal adulto lleva a cabo una tarea concreta, y consta de tejidos especializados. A su vez, los tejidos están constituidos por células también especializadas. Éstas muestran sólo una pequeña parte del gran potencial genético del huevo fecundado. La fracción de ese potencial genético utilizado en una célula depende de qué genes suyos se expresan y cuáles no. Cada célula se caracteriza por un patrón determinado de genes, activos e inactivos, que sufre cambios secuenciales a medida que el desarrollo avanza. Dado que el genoma de un organismo superior (su genética completa) puede contener hasta 50.000 genes, no parece probable que cada gen se regule individualmente. Hay que pensar que los genes se regulan en grupos, con un gen "rector" que controle la acción de cada grupo. Aunque hace ya tiempo que este esquema se viene considerando plausible, ha costado encontrar los genes rectores.

En los últimos cinco años se han ido identificando algunos de los genes rectores que controlan el desarrollo. Obviamente, para que éste proceda de forma correcta deben regularse con precisión tanto el momento en que ocurren los distintos procesos del desarrollo como la organización espacial de los tejidos en el embrión. Los genes recientemente identificados tienen que ver con ambas funciones. Un grupo de genes hallado en el nemátodo transparente *Caenorhabditis elegans* desempeña, por lo que parece, un papel crucial en la regulación temporal de la diferenciación celular del mismo. Sin embargo, los resultados más sorprendentes se refieren a la organización espacial del embrión, y provienen de trabajos realizados con la mosca *Drosophila melanogaster.* Usando los nuevos métodos de la biología molecular, hemos observado en mi laboratorio que muchos de los genes que controlan la organización espacial de *Drosophila* comparten cierto segmento de ADN. Este segmento, apelado caja homeótica, podría permitir a los genes que lo contienen regular la acción de agrupaciones de otros genes.

Cuando el gen que contiene la caja homeótica se traduce en una proteína, la caja homeótica produce una secuencia de aminoácidos que, así se cree, se une a la doble hélice de ADN. Al fijarse al ADN de unos genes concretos, la proteína podría activarlos o reprimirlos. Si la batería de genes adecuada se activara en un grupo de células del embrión de *Drosophila,* esas células se encauzarían por el camino que conduce a la conversión en parte de un ala; la activación de una batería distinta de genes en un segundo grupo de células podría llevarlas la formación de una parte de una pata. Más aún, la importancia de la caja homeótica trasciende el ámbito de *Drosophila*. La secuencia común de ADN se ha encontrado en una gama de organismos que va desde los gusanos hasta los seres humanos. Quizá la caja homeótica encierre la clave que abra los mecanismos de desarrollo en los organismos superiores. Se cumplan o no esas esperanzas,

1. PATRON DE EXPRESION del gen *dentellado* (*engrailed*). Se aprecia aquí en la distribución de 14 zonas brillantes en una sección fina de un embrión de la mosca del vinagre, *Drosophila melanogaster*. Las zonas brillantes denuncian la presencia de transcritos *dentellados* (moléculas de ARN mensajero que llevan la información del gen), que se acumulan en los lugares del embrión donde el gen se expresa. La figura reproduce una sección longitudinal de un embrión a las seis horas de la fecundación. En este estadio, el embrión ya se ha dividido en los segmentos característicos del cuerpo de la mosca (*clave a la izquierda*). Existen, por lo menos, tres segmentos cefálicos (*Md, Mx, Lb*), tres segmentos torácicos (*T1-T3*) y ocho segmentos abdominales completos (*A1-A8*). (Los segmentos abdominales, que formarán finalmente la parte posterior del insecto, se han desplazado sobre la superficie dorsal en un complejo movimiento de desarrollo.) Cada segmento se divide en un compartimiento anterior (*A*) y otro posterior (*P*). El gen *dentellado* (*engrailed*) se expresa en los 14 compartimientos posteriores y contribuye a proporcionarles su identidad. Los transcritos *dentellados* se detectaron mediante la técnica llamada de hibridación *in situ*. Se aplicó ADN marcado radiactivamente procedente del gen *dentellado* a una sección del embrión. El ADN hibridó, es decir, se unió selectivamente, con el mensajero ARN de *dentellado* (ARNm). Se cubrió el tejido con una emulsión fotográfica y se reveló. La porción de ADN radiactivo de los híbridos ADN-ARN impresionó los granos de plata de la emulsión, dando puntos brillantes.



2. OOCITO DE *DROSOPHILA* MELANOGASTER, o huevo sin fecundar. Se forma dentro de una estructura ovárica llamada folículo; la ilustración superior lo muestra en un corte transversal. El oocito y 15 células nutricias se forman a partir de la misma célula precursora en cuatro ciclos de división celular. Los puentes citoplásmicos permiten que las células nutricias transfieran al huevo ácido ribonucleico, proteínas y orgánulos celulares. Entre las sustancias así transferidas podrían hallarse moléculas que establezcan la polaridad espacial inicial del zigoto (huevo fecundado) en las etapas tempranas de la embriogénesis.

resulta incontrovertible que en los últimos cinco años la biología del desarrollo ha entrado en la fase en que las explicaciones pueden buscarse en el nivel molecular.

El hecho de que los genes que controlan la secuencia temporal de acontecimientos que ocurren en la embriogénesis fueran descubiertos en *C. elegans* se debe, en parte, al proyecto de desarrollo del pequeño nemátodo. El embrión de *C. elegans* procede en su desarrollo de forma tal que adquiere especial importancia el patrón cronológico de acontecimientos. Las células del embrión de *C. elegans* muestran poca flexibilidad. Estos gusanos tienen un número fijo de células y el destino de casi todas ellas está determinado por su linaje. Se puede conocer la genealogía de cada una de las 959 células del adulto y remontarse a través de sus predecesoras hasta el huevo fecundado. Las genealogías de estas células no varían esencialmente de un gusano a otro, a menos que el animal haya sufrido una mutación. Para dar lugar a las estructuras especializadas del adulto, los linajes deben ramificarse en el momento preciso.

Sydney Brenner, del Laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council de Cambridge, comenzó los estudios de *C. elegans* en los años sesenta. Desde entonces, varios investigadores han descubierto genes que controlan el momento en que se asignan los destinos a los distintos linajes celulares. Dichos genes, llamados cronogenes, se han descubierto al observar los efectos causados en ellos por las mutaciones. Las mutaciones específicas en los cronogenes alteran el desarrollo de los linajes celulares, provocando que se separen antes o después de lo que les correspondería en el organismo normal. *C. elegans* suele atravesar cuatro etapas larvarias y una adulta. Al final de cada etapa, el gusano muda y adquiere así una nueva cutícula (cubierta exterior). Una mutación particular en el gen llamado *lin-14* hace que el gusano mude dos veces más. Durante las etapas supernumerarias el desarrollo de la cutícula se retrasa: a pesar de que el animal ha alcanzado la madurez sexual, la cutícula es todavía larvaria.

Del efecto de esas mutaciones puede deducirse que el cronogén *lin-14* normal (tipo silvestre) tiene por misión provocar la diferenciación de las células formadoras de cutícula que producirán la del adulto en el momento correcto. Se han encontrado también otros cronogenes que intervienen en la diferenciación de muchos más linajes celulares. El control cronológico de los procesos del desarrollo reviste una importancia destacada en organismos como *C. elegans*, cuyo esquema formativo se basa en linajes celulares invariantes. Pero la mayoría de los organismos no se desarrollan así. De hecho, *C. elegans* está situado en un extremo del espectro de esquemas de desarrollo. En el otro extremo del espectro se encuentra el ratón y otros organismos cuyas células embrionarias gozan de una flexibilidad considerable. Una célula de embrión precoz de ratón puede terminar en casi cualquier estructura adulta. Su destino no está determinado por el lugar que tenga en un linaje fijo, sino por la posición espacial que ocupe, más o menos por casualidad, en el embrión precoz.

La mayoría de los organismos se encuentran entre estos extremos. Así *Drosophila*, que ha aportado la parte principal de cuanto conocemos acerca del control genético del desarrollo. Thomas Hunt Morgan, de la Universidad de Columbia, introductor de *Drosophila* en el laboratorio a principios de este siglo, se sirvió de ella para demostrar la base cromosómica de la herencia y el orden lineal de los genes en los cromosomas. Merced a algunas de sus características, *Drosophila* constituye un organismo excepcional para el estudio de la herencia. Recordemos entre otros rasgos sus cromosomas politénicos gigantes, presentes en muchas células, particularmente en las de las glándulas salivales. Mientras que los cromosomas de la mayoría de los seres contienen una copia de cada gen, los cromosomas politénicos de *Drosophila* incluyen hasta 1000 copias de cada gen, alineadas unas con otras a modo de cerillas en su caja. Gracias a esa abundancia, los genes individuales se pueden teñir y observar en el microscopio óptico en forma de bandas oscuras. Además, *Drosophila* es muy prolífica, con un tiempo de generación corto y un genoma relativamente pequeño.

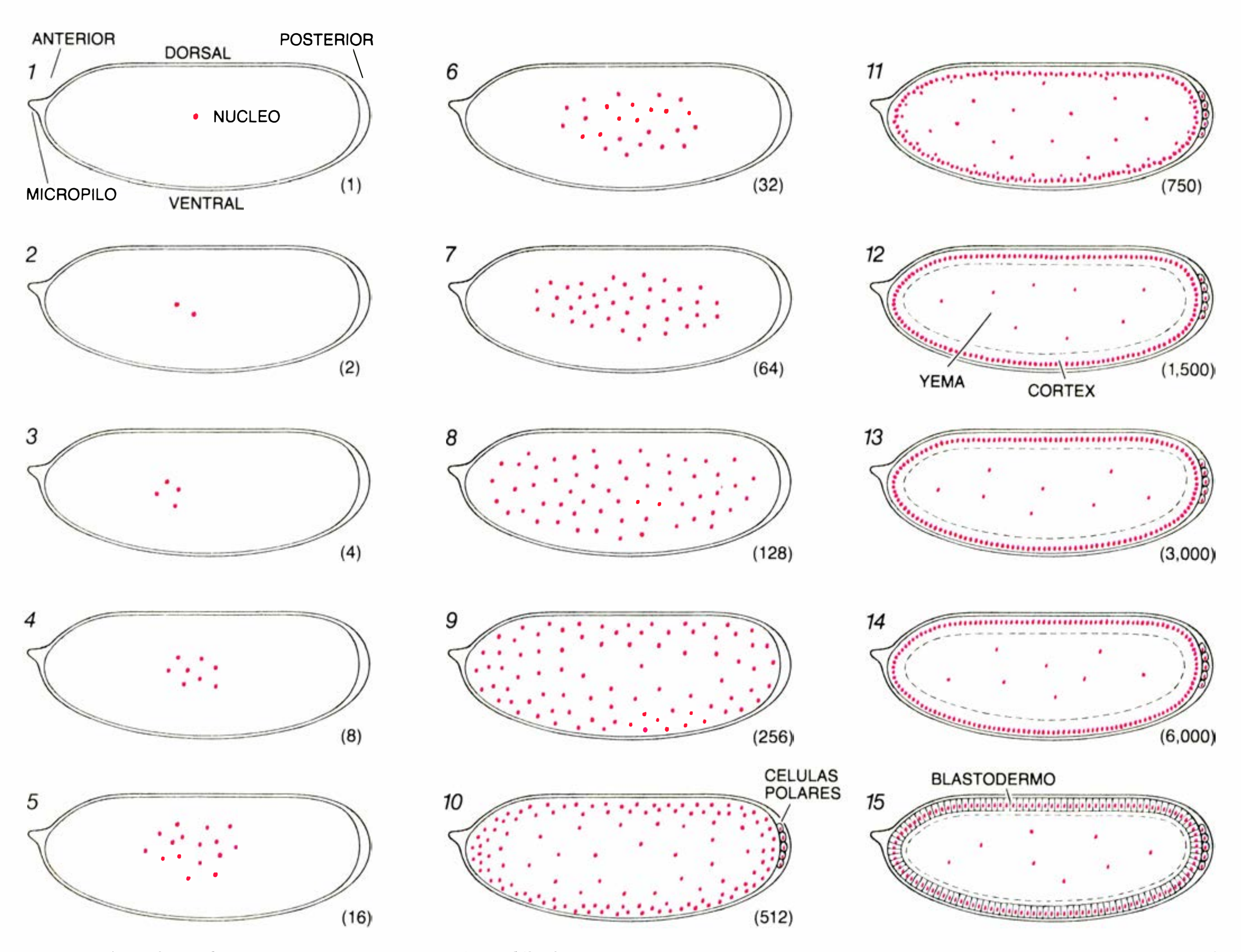
El desarrollo de un ejemplar de *Drosophila* comienza en el ovario de la hembra, donde una célula germinal primitiva empieza un patrón altamente especializado de división celular. La célula germinal se divide cuatro veces, dando 15 células nutricias y el oocito que más tarde se transformará en el huevo. Dentro de una estructura llamada folículo, las células nutricias alimentan al huevo. Proteínas, moléculas de ARN y orgánulos tales como mitocondrias penetran en el oocito a través de canales que lo conectan con las células nutricias. La contribución de estas células ayuda a construir el huevo y a prepararlo para la fecundación. Ésta acontece cuando el huevo y el espermatozoo se unen; el zigoto resultante contiene cromosomas de ambos padres. Casi inmediatamente, el núcleo del zigoto se divide; los núcleos hijos empiezan una serie de divisiones rápidas, una cada 10 minutos. Siempre que los núcleos se dividen, debe doblarse la cantidad de ADN en la célula. Esta formidable tarea mantiene plenamente ocupados a los núcleos del zigoto, sin que lleguen a expresarse muchos genes zigóticos.

En el modo habitual de división celular, los núcleos quedan separados por membranas celulares recién formadas. No ocurre así con los núcleos hijos del zigoto de *Drosophila*: comparten, mientras se dividen, un citoplasma común. Durante las primeras divisiones, los núcleos están dispersos por el citoplasma. Tras la octava división, cuando hay 256 núcleos, éstos inician su marcha hacia la superficie del huevo, hacia la capa llamada córtex; ubicados ya en el citoplasma cortical, se distribuyen por la periferia en una capa cuyo espesor viene a medir el de un núcleo. En este momento del desarrollo, se activa por fin un número sustancial de genes zigóticos. Después de 13 ciclos de división, las membranas celulares empiezan a dividir el citoplasma común y se forman las células. La monocapa celular resultante recibe el nombre de blastodermo.

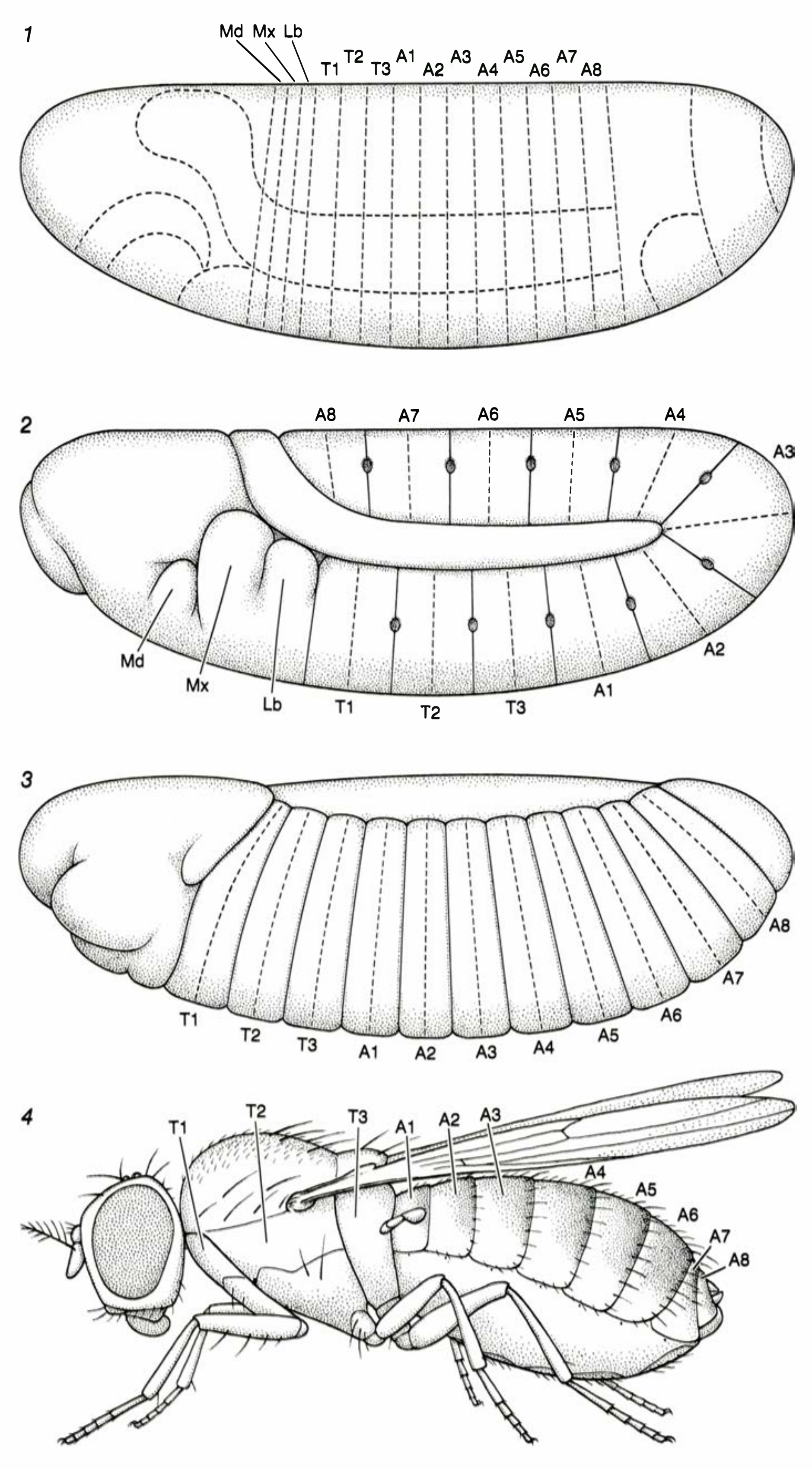
El embrión se desarrolla rápidamente en las horas siguientes, sufriendo una compleja reorganización espacial. En el proceso de gastrulación se forman las capas celulares interiores. Quizás el rasgo más sobresaliente de la transformación espacial sea la división del embrión en segmentos correspondientes a los segmentos del insecto adulto. Además de tres segmentos, por lo menos, que se retraen más tarde hasta el interior de la cabeza, los llamamos Md, Mx y Lb, existen otros tres segmentos torácicos (denominados T1, T2 y T3) y ocho segmentos abdominales completos (que van del A1 al A8).

Al día siguiente de la fecundación, el embrión sale del huevo y se transforma en una larva que mantiene el patrón segmentario del embrión. La larva muda dos veces, se convierte en pupa y, tras la metamorfosis, emerge la mosca adulta. La mosca adulta está organizada también en segmentos. Ahora bien, los tejidos de la epidermis adulta no se derivan directamente de la cubierta exterior de la larva, sino que provienen de los discos imaginales, que son pequeñas bolsas de epitelio que hay en el cuerpo de la larva. Mientras transcurre la metamorfosis, las bolsas se evaginan (se doblan hacia fuera) y se convierten en estructuras adultas. Así, a cada lado del cuerpo un disco produce el ojo y la antena; tres discos dan lugar a las patas, que se encuentran unidas a los tres segmentos torácicos, y un disco origina el ala y una parte importante del segmento torácico medio, al cual va unido el ala. Los discos imaginales sirven, pues, de bloques de construcción para el ensamblamiento del cuerpo adulto.

La facilidad con que se deja manipular el genoma de *Drosophila* ha posibilitado reconstruir la genealogía de las células desde las estructuras adultas hasta sus orígenes embrionarios. Tam-



3. ETAPAS INICIALES del desarrollo de un embrión de *Drosophila*. Conllevan repetidas divisiones de los núcleos en un citoplasma común. El espermatocito penetra en el huevo a través del micropilo, que está en la parte anterior del oocito (*1*). El núcleo del espermatocito se une al del huevo. Poco después de la fecundación comienzan ciclos sincronizados de división nuclear que doblan el número de núcleos cada 10 minutos (*2-8*). Concluida la octava división, cuando hay 256 núcleos, éstos empiezan a desplazarse hacia el córtex, o periferia, del huevo (*9*). Llegados a los 512 núcleos, se forman las primeras membranas celulares en torno a un grupo de células de la parte posterior del huevo (*10*). Estas "células polares" originarán las células germinales de la mosca adulta. Los otros núcleos siguen dividiéndose en el córtex (*11-14*). Con 6000 núcleos en la periferia, las membranas separan los núcleos en una monocapa: el blastodermo (*15*).

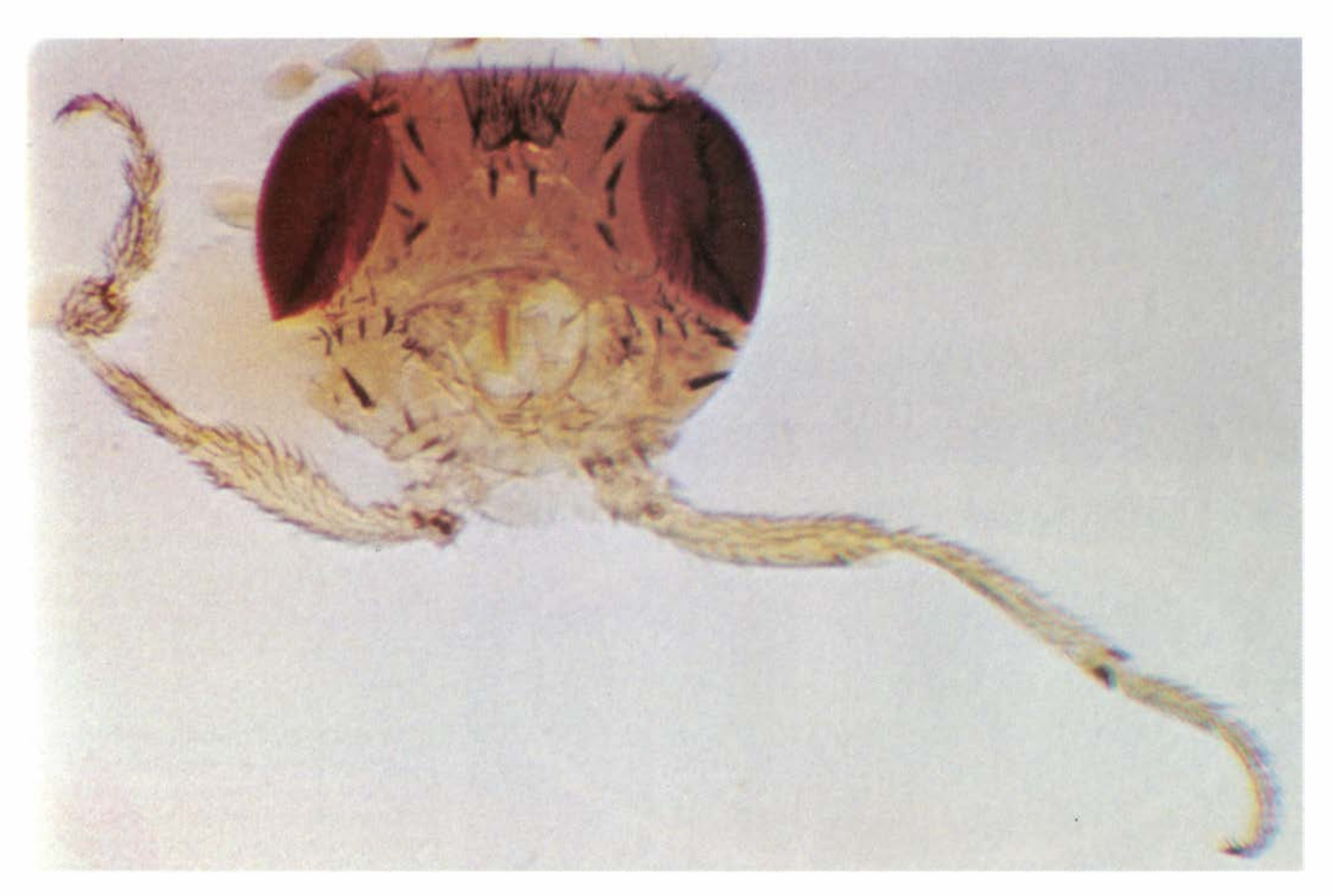


4. ENTRE LAS ETAPAS TARDIAS del desarrollo embrionario de *Drosophila melanogaster* se incluyen la división del cuerpo en segmentos y movimientos morfogenéticos complejos. Poco después de la formación del blastodermo, algunas de sus regiones quedan determinadas o destinadas a formar estructuras corporales específicas. Por medio de varios tipos de experimentos se ha podido remontar la genealogía de las estructuras hasta las partes del blastodermo en donde se originaron. El resultado es un "mapa de destinos" del blastodermo, en el cual los segmentos corporales aparecen como bandas consecutivas (*1*). El embrión se alarga y los segmentos abdominales se desplazan por la superficie dorsal en la dirección anterior (*2*). En esta etapa, se expresa el gen *dentellado* (*engrailed*) y se subdividen los segmentos. El embrión se estrecha de nuevo, los segmentos abdominales retroceden hacia la parte posterior y los límites segmentarios se hacen visibles (*3*). El embrión sale del huevo convirtiéndose en una larva que muda dos veces, pupa y se transforma en adulto (*4*). El adulto está segmentado, pero su cubierta externa no se deriva de la larva. Las estructuras adultas proceden de unas bolsas de células, llamadas discos imaginales, que se encuentran en el cuerpo de la larva.

bién ha permitido averiguar cuándo los grupos de células quedan abocados a cumplir sus destinos particulares. Se pueden usar dosis de rayos X controladas con precisión para inducir mutaciones y recombinaciones genéticas (intercambios de ADN entre cromosomas) en los embriones de *Drosophila*. Los efectos de dichas aberraciones genéticas sirven de marcadores de células o núcleos concretos. Las unidades marcadas pueden seguirse hasta la mosca adulta para averiguar en qué momento quedaron determinadas, es decir, comprometidas en la producción de una parte concreta de la larva o del adulto. Usando estos métodos, se ha visto que antes de la formación del blastodermo los núcleos poseen una flexibilidad total. Un núcleo puede colonizar cualquier parte del citoplasma cortical, y los descendientes de un núcleo preblastodérmico pueden encontrarse después en cualquier zona de la mosca adulta. El clon, o grupo de células descendientes, tiende a mantenerse unido, pero puede formar una parte de cualquier estructura adulta.

Sin embargo, poco tiempo después de la constitución del blastodermo, el proceso de determinación empieza a avanzar rápidamente. La determinación inicial afecta tanto a los precursores de los segmentos embrionarios y larvarios cuanto a los de los discos imaginales, que formarán estructuras adultas. Experimentos realizados en mi laboratorio en los primeros años de la década de los 70 mostraron que, desde la etapa de blastodermo precoz, los precursores de los discos imaginales se ven obligados a formar o estructuras adultas anteriores o estructuras adultas posteriores. Los embriones blastodérmicos precoces pueden desgajarse en células individuales, para luego "cultivarlas" transplantándolas en el interior de la cavidad abdominal de una mosca adulta o de una larva. Las células tratadas así alcanzan su desarrollo completo en cultivo y forman estructuras adultas. Cuando se realizó este experimento, las células procedentes de la parte anterior del blastodermo produjeron únicamente estructuras adultas anteriores, mientras que las células de la parte posterior del blastodermo dieron lugar únicamente a estructuras adultas posteriores.

Se analizó el destino de células individuales marcándolas genéticamente en el blastodermo y siguiendo su desarrollo hasta la fase adulta, cuando la progenie de la célula marcada forma un clon. Se vio que los clones respetaban los límites segmentarios: ni si-



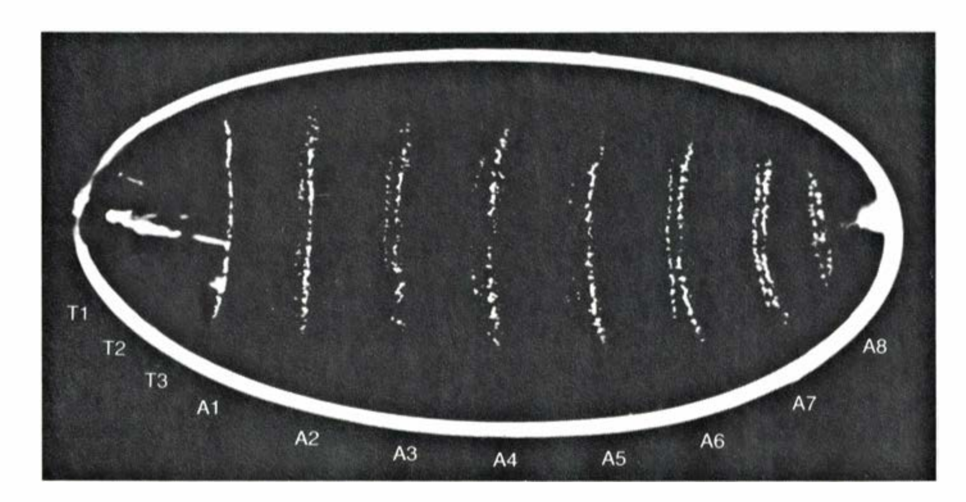
5. LA NASOBEMIA es una mutación que hace crecer patas en la cabeza de *Drosophila* en vez de las antenas correspondientes. La mutación transforma los discos imaginales, que originarían las antenas, en el tipo de disco que crea el par medio de los tres pares de patas de la mosca. Del efecto producido por la mutación se dedujo que el objetivo del gen normal era asegurar que cada disco imaginal forme la estructura adulta correcta. La *Nasobemia* fue descubierta por el autor en 1965. Pertenece a un grupo de mutaciones que transforman una estructura en otra situada en otro segmento; dichas mutaciones se llaman homeóticas.

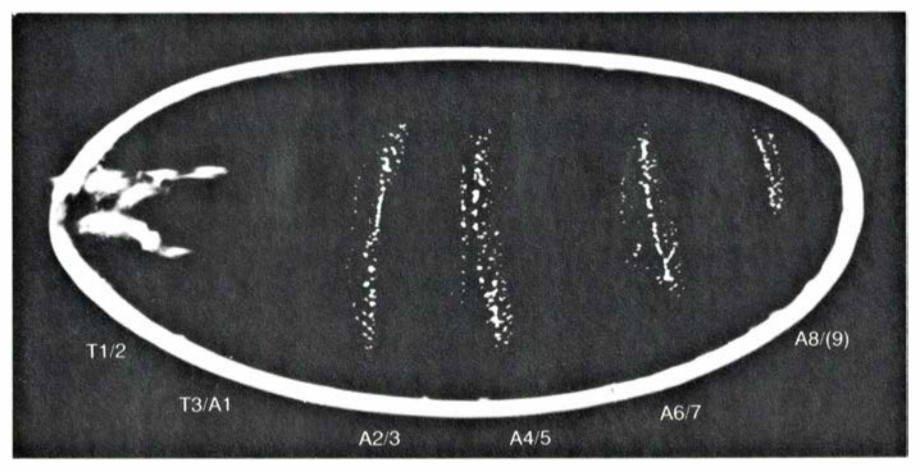
quiera los clones de gran tamaño marcados cruzaban el límite entre un segmento y el adyacente. Este resultado ponía de manifiesto que las células del blastodermo estaban ya forzadas a transformarse en parte de un segmento concreto. Se obtuvo más información destruyendo grupos pequeños de células de blastodermo con un microhaz proveniente de un láser: un haz de radiación ultravioleta focalizado con gran precisión. El destino de las células destruidas se puede inferir observando los defectos que aparecen en el adulto. Al representar sobre una imagen del blastodermo los datos proporcionados por el microhaz, se obtiene un "mapa de destinos" del blastodermo, que correlaciona las regiones de éste con las estructuras del cuerpo. Los segmentos larvarios y adultos aparecen en el mapa como un patrón ordenado de bandas.

Así pues, la arquitectura segmentada de *Drosophila* se encuentra ya establecida en la fase blastodérmica y los grupos de células en el blastodermo están asignados a un segmento en el cuerpo de la larva y del adulto. Sin embargo, la asignación de destinos celulares no se acaba en la fase blastodérmica. En cuanto los segmentos se hayan establecido, se asigna cada célula del segmento a la mitad anterior del mismo o a la mitad posterior, quedando el segmento dividido en dos compartimientos: uno anterior y otro posterior. Tras la formación de los compartimientos, se determinan las estructuras adultas. Primero, los discos imaginales se distinguen unos de otros. Los discos contienen muchas regiones pequeñas, que se corresponden con una parte de la estructura adulta, tal como el segundo segmento de una pata. Los destinos de estas regiones pequeñas se asignan durante una serie de pasos que, por lo que parece, no terminan hasta los últimos días de la larva. En el momento de la metamorfosis, cada grupo pequeño de células determinadas en el disco imaginal se transforma, bajo la influencia de hormonas, en la estructura adulta correspondiente.

La conclusión general de los experimentos de marcaje genético fue que las células del embrión de *Drosophila* iban quedando determinadas en una serie de grados progresivamente más finos que no concluía hasta la metamorfosis. ¿Cómo se ejecuta esta serie de etapas? Mucho antes de la era de la genética molecular, se obtuvieron algunos indicios sobre el mecanismo de determinación, a partir de las observaciones realizadas sobre tres curiosos tipos de mutaciones que alteraban el proceso de desarrollo de *Drosophila*: mutaciones de efecto materno, mutaciones de segmentación y mutaciones homeóticas. Algunas mutaciones de efecto materno intervienen en la polaridad espacial del embrión. Por ejemplo, en un folículo normal las células nutricias se encuentran solamente cerca del polo anterior del huevo. En la mutación dicefálica (*dicephalic*) las células nutricias se encuentran en ambos polos. Dichos folículos bipolares producen embriones que poseen dos conjuntos de estructuras anteriores unidas por el centro y carecen por completo de estructuras posteriores.

De los datos genéticos cabe inferir que estos monstruos de dos cabezas débense a defectos en el genoma de sus madres. Las hembras de *Drosophila* homozigóticas para la mutación dicefálica, que tienen dos copias del gen deficiente, producen folículos aberrantes (y de ahí embriones aberrantes), sea cual fuere la contribución genética del padre. Las madres heterozigóticas, con





6. FUSHI TARAZU es un gen de segmentación, es decir, un gen cuya acción es necesaria para que el embrión de *Drosophila melanogaster* se divida correctamente en segmentos. Un embrión con el gen silvestre –normal– de *fushi tarazu* tiene como mínimo el conjunto entero de tres segmentos cefálicos, tres segmentos torácicos y ocho segmentos abdominales completos (*ilustración superior*). Durante el desarrollo, los segmentos de cabeza se retraen dentro del cuerpo y por tanto no son visibles. El borde anterior de cada segmento está señalado por una banda de diminutas proyecciones llamadas dentículas. Las bandas denticulares aparecen en la ilustración en forma de bandas blancas que cruzan las imágenes. Los embriones que han sufrido una mutación en el gen *fushi tarazu* carecen de algunas partes de los segmentos corporales alternados y las partes restantes están fusionadas (*ilustración inferior*). Por ejemplo, la parte posterior de A2 se encuentra ausente junto con la parte anterior de A3; la parte ausente de A3 incluye la banda denticular. Las restantes partes de A2 y A3 se han fusionado para producir el segmento compuesto A2/3. Se trata de una mutación letal, es decir, el embrión resultante presenta la mitad del número normal de segmentos y muere antes de salir del huevo.

un gen deficiente y otro normal, producen únicamente huevos normales. Este resultado muestra que la polaridad anteroposterior se establece cuando el huevo se forma en el ovario bajo el control del genoma materno. Otros mutantes de efecto materno alteran la polaridad dorsoventral. Las observaciones de los mutantes de efecto materno sugieren que el citoplasma del huevo contiene sustancias que definen las coordenadas espaciales del futuro embrión. Después de la fecundación, cuando los núcleos se desplazan hasta el córtex del huevo, encuentran estas sustancias y quedan determinados a cumplir unos destinos concretos según su posición en el citoplasma cortical.

El interés de los mutantes de efecto materno reside en que sugieren que algunos de los primeros pasos en el proceso de la determinación ocurren bajo la influencia del genoma materno y no bajo la del genoma del huevo fecundado. Sin embargo, poco se sabe en la actualidad acerca de las sustancias codificadas por los genes maternos que dotan al citoplasma del huevo de su polaridad espacial. Hay algunos indicios de que el ARN mensajero materno (ARNm) almacenado en el huevo contribuye a la especificación de la polaridad dorsoventral, pero la mayoría de las demás sustancias citoplásmicas que intervienen en estos procesos siguen siendo desconocidas. En cambio, durante los últimos años se ha adelantado considerablemente en la comprensión del funcionamiento de los genes de segmentación y de los genes homeóticos. De hecho, estos dos tipos de genes han constituido la puerta de acceso al nivel molecular de la biología del desarrollo.

La mayoría de las mutaciones de segmentación y de las mutaciones homeóticas se expresan sólo después de la activación del genoma zigótico durante la formación del blastodermo. Cada mutación de segmentación se interfiere de una forma concreta en la división ordenada del embrión en subunidades repetitivas. Uno de los mutantes de segmentación más notables es *fushi tarazu*, expresión japonesa que significa "segmentos insuficientes". En un embrión *fushi tarazu* faltan partes de ciertos segmentos, y las partes incompletas están fusionadas con los segmentos adyacentes. Así, la parte anterior de los segmentos Mx, T1, T3, A2, A4, A6 y A8 se fusiona con la parte posterior de los segmentos que les siguen [*véase la figura 6*]. El resultado es un embrión que tiene siete segmentos en lugar de 14 y muere antes de salir del huevo y transformarse en larva. *Fushi tarazu* es una mutación más entre el gran número de ellas que afectan al patrón segmentario.

Sin embargo, los trastornos más espectaculares del desarrollo de *Drosophila* son los producidos por las mutaciones homeóticas. La mutación homeótica conlleva la transformación de una parte del cuerpo en otra situada normalmente en un segmento distinto. Los resultados de dichas transformaciones son grotescos y desconcertantes. Alas que crecen en el lugar de los ojos, patas en el lugar de la probóscide (tubo de alimentación), patas que se transforman en antenas, etcétera. Me he sentido fascinado por las mutaciones homeóticas desde 1965, cuando, trabajando como estudiante graduado en la Universidad de Zurich, descubrí un mutante que tenía patas en la cabeza en vez de antenas. Buscando un nombre para la mutación, me vino a la mente una creación de Christian Morgenstern, poeta alemán que describía una criatura fantástica llamada el Nasobemo, que caminaba sobre su nariz. La coincidencia me divirtió y decidí llamar *Nasobemia* a la mutación.

La clase de mutaciones a que pertenece *Nasobemia* es amplia y diversa. Se le ha dedicado un considerable número de trabajos. Se ha visto que, en *Drosophila*, la mayoría de los genes homeóticos se distribuyen en dos grupos. Uno, que constituye el complejo *Antennapedia*, comprende los genes que determinan las estructuras adultas de la cabeza y de los segmentos torácicos anteriores. *Nasobemia* se presenta en el complejo *Antennapedia*. El otro complejo se llama *bithorax* e incluye los genes que controlan la determinación de los segmentos torácicos posteriores y los abdominales. Edward B. Lewis, del

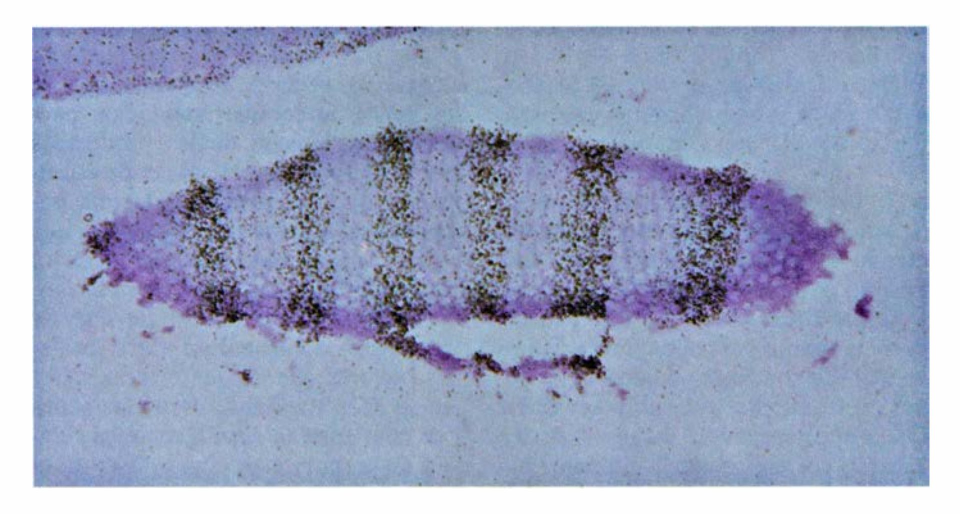
Instituto de Tecnología de California, basándose en su análisis exhaustivo del complejo *bithorax*, propuso que cada segmento posterior del adulto está determinado por la actividad combinada de un único grupo de genes homeóticos. Según el modelo de Lewis, la determinación del segundo segmento torácico (el segmento más anterior de los controlados por el complejo *bithorax*) requiere un número mínimo de genes homeóticos. Los sucesivos segmentos posteriores precisan la activación de uno o más genes homeóticos adicionales para conseguir su carácter.

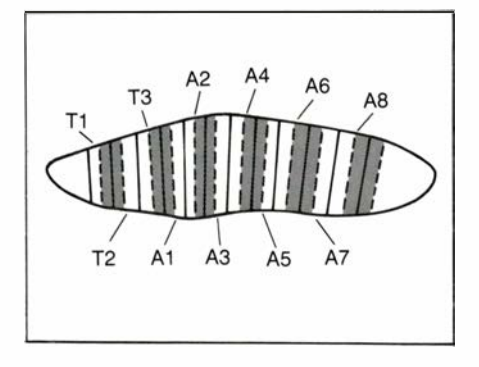
Resultaba tan profunda la alteración que producen las mutaciones homeóticas y las mutaciones de segmentación que obligó a pensar si los genes correspondientes no servirían para organizar el proceso normal del desarrollo. Dado que una mutación de segmentación entorpece el establecimiento de los segmentos embrionarios, parece razonable que el gen normal regule la construcción correcta de esos segmentos. Puesto que una mutación homeótica produce patas donde deberían crecer antenas, el gen normal tiene que ser responsable de la formación de patas en el lugar adecuado. Ahora bien, cualquier gen capaz de organizar semejantes procesos fundamentales en el desarrollo normal debe funcionar regulando muchos otros genes. Mediante experimentos de genética bacteriana se había mostrado ya que grupos amplios de genes podían regularse por la acción de un gen singular, que codifica una proteína que se fija al ADN e inhibe o activa la transcripción de los grupos en cuestión. Parecía, pues, que el modelo bacteriano suministraba un modelo plausible del funcionamiento de los genes rectores del desarrollo. Sin embargo, hasta 1978 dichas ideas pertenecían al dominio de la especulación, porque no existían métodos adecuados para aislar y experimentar con genes de desarrollo en organismos superiores.

En el intervalo de unos cuantos años, la situación cambió drásticamente con la aparición de métodos de clonación de genes que permiten su aislamiento sin disponer de ninguna información bioquímica sobre sus productos. Inmediatamente varios grupos de investigación se dispusieron a purificar los genes homeóticos de *Drosophila*. David S. Hogness y sus colegas, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Stanford, abrieron camino con sus experimentos con el complejo *bithorax*, mientras que mi grupo se centró en los genes del grupo *Antennapedia*. Cuando se logró purificar los genes homeóticos, vióse que eran sorprendentemente grandes y complejos. Así, el gen *Antennapedia* abarca 100.000 pares de bases de nucleóticos, un número inusitadamente alto. Además, los genes homeóticos tienen una estructura compleja que comprende muchos exones separados por intrones. Los intrones son secuencias de ADN que se transcriben en ARN, para desprenderse inmediatamente de lo transcrito; únicamente resisten los exones, que se empalman y forman el ARN maduro. En el procesamiento de lo transcrito, de *Antennapedia*, se pueden desechar hasta 60.000 pares de bases en un solo intrón.

Para llegar a este conocimiento sobre la estructura de los genes homeóticos hubo que esperar a aislar alguno de ellos. El gen de *Antennapedia*, que dio su nombre al complejo *Antennapedia*, fue aislado por Richard Garber y Atsushi Kuroiwa, ambos de mi grupo. El primer paso consistió en reunir un conjunto de fragmentos de ADN consecutivos, que se solapaban parcialmente, y que abarcaban la región cromosómica a la que pertenecía *Antennapedia*. Esto se llevó a cabo por el método llamado "paseo a lo largo del cromosoma", original de Hogness. El paseo cromosómico se basa en la índole complementaria de las dos cadenas de la hélice de ADN, gracias a lo cual pueden hibridar, o sea, formar una molécula de doble cadena. Si dos trozos de ADN procedentes de cadenas opuestas de la doble hélice están ligeramente superpuestos, hibridarán en la región de superposición. Al "pasear" se empieza con un fragmento de ADN corto que se sabe cercano al deseado. Mediante la hibridación, se identifica otro pedazo de ADN, solapante con el fragmento conocido en su extremo y prolongándose hacia el gen deseado. Repitiendo el proceso, se puede cubrir y aislar el segmento cromosómico completo que incluye al gen.

Tras reunir el conjunto de fragmentos de ADN, era necesario conocer la localización precisa del gen *Antennapedia* en el segmento cromosómico. Para encontrarlo, aislamos primeramente un clon de ADNc, un fragmento de ADN complementario al ARNm de *Antennapedia*. El clon hibridaría las secuencias de ADN cromosómico complementarias con la molécula de ARNm. Se empleó este clon a modo de sonda que descubriera la secuencia de ADN que codifica el ARNm de *Antennapedia*. Para nuestra sorpresa, dicha sonda no hibridaba sólo con las secuencias codificantes de *Antennapedia*, sino también con secuencias de un gen vecino, gen que resultó ser *fushi tarazu*, lo que puso de manifiesto que





7. SE EXPRESA EL FUSHI TARAZU en pares de segmentos en el embrión precoz. La ilustración muestra la sección fina de un embrión a las dos horas y media de la fecundación. Los círculos pálidos, apreciables con mayor nitidez en el lado derecho de la imagen, son núcleos que acaban de llegar al córtex y no están todavía separados por membranas celulares. Las bandas oscuras son de ARNm del gen *fushi tarazu* localizadas por medio de hibridación *in situ*. (Los granos de plata pueden aparecer oscuros o brillantes en la imagen fotográfica escogiendo el sistema óptico apropiado.) Cada banda abarca dos segmentos embrionarios, como muestra la clave. Esta sección no contiene los segmentos de la cabeza. Si así fuera, se verían siete bandas oscuras, no seis.

	1																			20
RATON *MO*-10	Ser	Lys	Arg	Gly	Arg	Thr	Ala	Tyr	Thr	Arg	Pro	Gln	Leu	Val	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
RANA *MM*3	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
ANTENNAPEDIA	Arg	Lys	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
FUSHI TARAZU	Ser	Lys	Arg	Thr	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe
ULTRABITHORAX	Arg	Arg	Arg	Gly	Arg	Gln	Thr	Tyr	Thr	Arg	Tyr	Gln	Thr	Leu	Glu	Leu	Glu	Lys	Glu	Phe

	21																			40
RATON *MO*-10	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Met	Arg	Pro	Arg	Arg	Val	Glu	Met	Ala	Asn	Leu	Leu	Asn	Leu
RANA *MM*3	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Val	Leu	Cys	Leu
ANTENNAPEDIA	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Ile	Ala	His	Ala	Leu	Cys	Leu
FUSHI TARAZU	His	Phe	Asn	Arg	Tyr	Ile	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Asp	Ile	Ala	Asn	Ala	Leu	Ser	Leu
ULTRABITHORAX	His	Thr	Asn	His	Tyr	Leu	Thr	Arg	Arg	Arg	Arg	Ile	Glu	Met	Ala	Tyr	Ala	Leu	Cys	Leu

	41																			60
RATON *MO*-10	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Tyr	Lys	Lys	Asp	Gln
RANA *MM*3	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn
ANTENNAPEDIA	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Trp	Lys	Lys	Glu	Asn
FUSHI TARAZU	Ser	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Ser	Lys	Lys	Asp	Arg
ULTRABITHORAX	Thr	Glu	Arg	Gln	Ile	Lys	Ile	Trp	Phe	Gln	Asn	Arg	Arg	Met	Lys	Leu	Lys	Lys	Glu	Ile

8. SE LLAMA DOMINIO HOMEOTICO a la secuencia de aminoácidos correspondiente a la caja homeótica. La caja homeótica es un trozo corto de ADN que se encuentra en más de una docena de genes homeóticos y de genes de segmentación de *Drosophila*, así como en genes procedentes de una amplia gama de organismos superiores. La ilustración muestra la secuencia de 60 aminoácidos (designados por su código de tres letras) en los dominios homeóticos que resultan de cinco genes. Son el gen *MO*-10 de ratón, el gen *MM*3 de rana y tres genes de *Drosophila: Antennapedia, fushi tarazu* y *Ultrabithorax*. El gen de *Antennapedia* se ha utilizado como patrón de comparación. Las discrepancias entre el dominio homeótico de *Antennapedia* y los de otros genes aparecen en blanco. Los cinco dominios homeóticos son bastante similares. Este parecido sugiere que el dominio homeótico cumple la misma función en las cinco proteínas, y que la presión selectiva ha impedido que las secuencias de aminoácidos varíen mucho de un caso a otro. No se conoce bien el funcionamiento de las proteínas que contienen el dominio homeótico. En efecto, siendo todos los dominios homeóticos ricos en lisina (*lys*) y arginina (*arg*), dos aminoácidos básicos, éstos podrían permitir al dominio homeótico fijarse en el ADN. Al unirse a secuencias específicas de ADN, esas proteínas podrían regular la acción de muchos otros genes y ejercer así un control en el desarrollo. La región por donde la proteína se une al ADN está constituida por una secuencia de nueve aminoácidos, idéntica en los cinco dominios homeóticos (*color intenso*).

fushi tarazu y *Antennapedia* compartían un corto fragmento de ADN. (Matthew P. Scott, de la Universidad de Colorado en Boulder, llegó por su cuenta a la misma conclusión.) Quisimos comprobar la posibilidad de que la secuencia común fuera característica de los genes homeóticos. Para ello, examinamos un gen en el complejo *bithorax* llamado *Ultrabithorax*. Mi colega William J. McGinnis (hoy en la Universidad de Yale) encontró ese fragmento de ADN en *Ultrabithorax*.

El sorprendente descubrimiento en mi laboratorio de este segmento común de ADN, en 1983, instó una búsqueda inmediata por todo el genoma de *Drosophila*. Con esa corta secuencia común por sonda, no tardamos en identificar más de una docena de genes que contenían secuencias similares. Dado que muchos de los genes recién aislados correspondían a mutantes homeóticos conocidos, llamamos caja homeótica a la secuencia común. Al parecer, todos los genes que incluyen la caja homeótica son homeóticos o están implicados en la determinación de la organización espacial del embrión. Casi todos ellos se alojan en el complejo *Antennapedia* o en el complejo *bithorax*. Se sabía que los genes de estos dos complejos estaban implicados en la determinación de la organización espacial y ya se había identificado muchos de ellos. Sin embargo, algunos de los demás genes que poseen la caja homeótica están en otras partes del genoma, sin que se les haya conseguido identificar por medio de mutaciones.

Es de notar que entre los genes que contienen la caja homeótica se encuentran genes de segmentación, como *fushi tarazu*, y genes implicados en la división de los segmentos en compartimientos, como el gen *dentellado* (*engrailed*). A pesar de que los efectos físicos de los genes de segmentación y de los genes de compartimentación pueden diferir mucho de los producidos por los genes homeóticos, el descubrimiento de la presencia de la caja homeótica en los tres grupos muestra que comparten un elemento significativo. El descubrimiento de este elemento común refuerza la hipótesis de que las tres clases se encuentran entre los genes rectores que dirigen el desarrollo. No se sabe todavía si todos los genes que contienen la caja homeótica derivan de un antecesor común o su parecido estriba únicamente en el exón que contiene la caja homeótica. Los próximos trabajos deben encaminarse a resolver pronto esta importante cuestión.

Establecida la existencia de la caja homeótica en la mosca, nos aprestamos a descubrirla en nuevos genomas. No nos sorprendió encontrar la secuencia común en otras especies de *Drosophila* y en insectos en los que se sabía que se producen mutaciones homeóticas, como los escarabajos. El examen de los gusanos anélidos, antecesores de los insectos, mostró que también poseen la caja homeótica. Sin rebajar el interés de este hallazgo, muchísimo más sorprendente fue descubrir que los vertebrados presentan también la caja homeótica. En colaboración con mi colega Edward De Robertis y su grupo, el nuestro consiguió aislar la primera caja homeótica de vertebrado, de la rana *Xenopus laevis*. Todos los demás vertebrados estudiados posteriormente, seres humanos incluidos, manifestaron poseer secuencias homólogas o similares. De acuerdo con un ensayo provisional de revisión, la caja homeótica está presente en todos los grupos de animales segmentados. Aunque no se ha detectado en la mayoría de los grupos de animales que carecen de segmentos, sí parece hallarse en los erizos de mar.

Los primeros indicios sobre el modo de acción de la caja homeótica en el plano molecular (a nivel molecular, si transigimos con el anglicismo) se obtuvieron al comparar las secuencias de ADN de varias cajas homeóticas. Ya se han establecido más de una docena de estas secuencias. Del cotejo de las mismas se ha visto que la homología entre secuencias de cajas homeóticas se circunscribe a una región de 180 pares de bases. La homología fluctúa entre el 60 y el 80 por ciento, según los genes. Todas las cajas homeóticas estudiadas hasta el momento pueden traducirse en cadenas de aminoácidos, lo que sugiere que la caja homeótica codifica un dominio, o segmento funcional, de una proteína. A este dominio se le ha llamado dominio homeótico. Las secuencias de aminoácidos correspondientes a las distintas cajas homeóticas guardan entre sí mayor semejanza que las secuencias de nucleótidos de las propias cajas homeóticas. (Esto es posible porque un mismo aminoácido puede ser codificado por más de un triplete, que es un grupo de tres nucleótidos.) Por ejemplo, las cadenas de aminoácidos correspondientes a las cajas homeóticas del gen *Antennapedia* y del gen *MM*3 de *Xenopus* comparten 59 de sus 60 aminoácidos, una homología sorprendente si se considera que los vertebrados e invertebrados se separaron hace más de 500 millones de años. La similitud entre las cadenas de aminoácidos implica que todos los dominios homeóticos funcionan aproximadamente del mismo modo y que ha habido una intensa presión selectiva para evitar la pérdida de su función.

¿Cuál podría ser esa función común? Tal como indicaba antes, una de las primeras hipótesis era que los genes rectores operaban dirigiendo la síntesis de

proteínas que se unen al ADN. La caja homeótica es bioquímicamente compatible con tal modelo. Muchas proteínas que se unen al ADN poseen regiones ricas en aminoácidos básicos. El dominio homeótico, que forma parte de proteínas mayores, es rico en lisina y arginina, dos aminoácidos básicos. Una primera indicación de que el dominio homeótico pudiera estar implicado en las uniones con el ADN surgió de una comparación por ordenador con secuencias conocidas de ADN. En la búsqueda se detectó una pequeña homología, pero aún así significativa, entre la caja homeótica y trozos de genes en dos especies de levadura, llamados genes MAT. Cada gen MAT codifica una proteína que regula todos los genes necesarios para controlar la diferenciación de las levaduras en uno u otro de los dos tipos de apareamiento existentes o para la formación de esporas. La proteína realiza su función uniéndose a secuencias específicas de ADN que se encuentran al comienzo de los genes a regular (hacia el extremo 5′ del ADN). La homología parcial entre la caja homeótica y las secuencias del gen MAT de la levadura sugiere una función similar para el dominio homeótico.

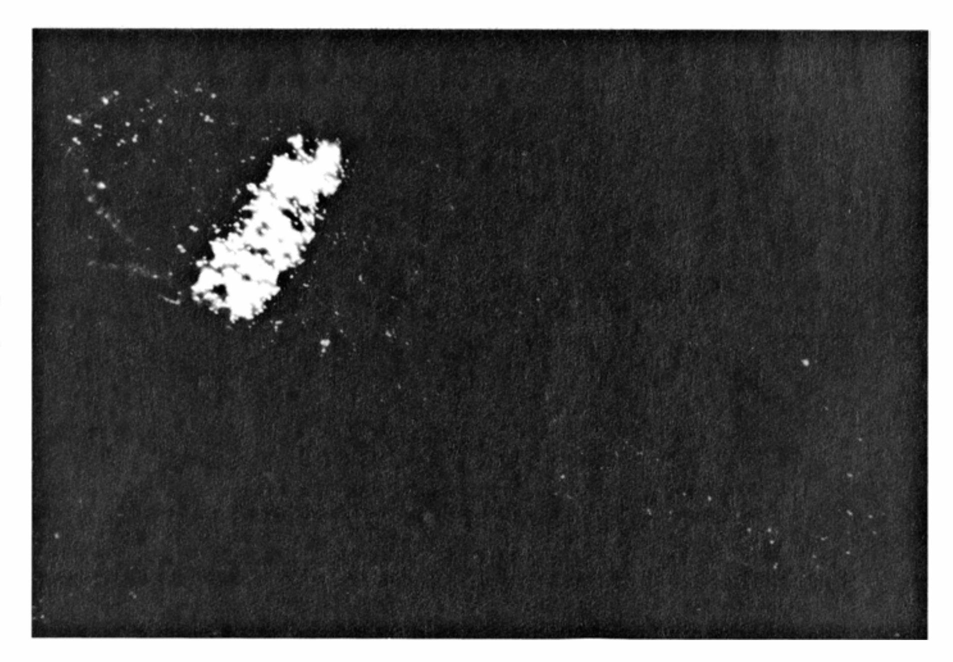
Si el dominio homeótico controla la determinación, la expresión de los genes que poseen la caja homeótica se debe regular con precisión en el tiempo y en el espacio durante la embriogénesis. El patrón espacial de la expresión genética se está estudiando en la actualidad mediante la hibridación *in situ* (con ello se quiere decir que no se trabaja en el tubo de ensayo, sino en los tejidos del organismo). Esta técnica se basa en la hibridación de un trozo de ADN de cadena sencilla de un gen con el correspondiente transcrito ARNm. Dado que el ARNm se acumula en las regiones del embrión donde se expresa el gen, la hibridación puede mostrar el patrón espacial de la expresión génica. Las sondas se preparan purificando genes que contienen la caja homeótica y marcándolos radiactivamente. Una gota de solución que contenga la sonda se deposita sobre una sección fina del embrión de *Drosophila*. Se deja que la sonda hibride con su transcrito, y se cubre la sección con una emulsión fotográfica. Dejada la preparación sensible un tiempo adecuado, se revela la emulsión y entonces las sondas radiactivas de ADN ligadas a ARNm homólogo aparecen en forma de granos oscuros o claros, según sea el sistema óptico elegido. Ernst Hafen y Michael Levine refinaron esta técnica en mi laboratorio para posibilitar la detección de transcritos procedentes de genes homeóticos.

Algunos de los resultados más interesantes de la hibridación *in situ* se han obtenido usando *fushi tarazu* por sonda. Los transcritos de *fushi tarazu* se empiezan a detectar en los núcleos alineados en el citoplasma cortical, antes de que se formen las membranas celulares. A medida que los núcleos se van dividiendo, aumenta la transcripción y muy pronto los granos oscuros forman un espectacular diagrama de siete bandas alrededor del blastodermo. El mapa de destinos muestra que esas zonas corresponden precisamente a las siete secciones ausentes en el mutante *fushi tarazu*. Una vez constituidos los segmentos embrionarios, desaparecen los transcritos. De estos resultados se deducen dos puntos importantes sobre el funcionamiento de *fushi tarazu*. Al inicio de la embriogénesis, el gen normal se debe expresar en secciones alternas para que se establezca el plan segmentario; luego ya no es necesario.

El hecho que el gen normal de *fushi tarazu* se exprese espacialmente con precisión antes de que se formen las membranas celulares, implica que los propios núcleos tienen un "sensor" que les permite identificar su posición en el citoplasma cortical. Mi opinión es que el sensor constituye una región de control adyacente al gen *fushi tarazu* y a otros genes implicados en la elaboración del patrón segmentario. Se investigó sobre esta posibilidad creando un gen artificial que incluía la región de control del gen *fushi tarazu* y el gen bacteriano de la enzima beta-galactosidasa. La expresión del gen sintético queda controlada por la secuencia de *fushi tarazu*, pero la proteína producida por el gen es la bacteriana.

Se inserta el gen artificial en un embrión de *Drosophila*. La expresión del gen de beta-galactosidasa se detecta por reacción química que excita un colorante. Cuando se realiza el experimento se encuentra la beta-galactosidasa distribuida según un diagrama de siete franjas que coincide cabalmente con el patrón de los transcritos de *fushi tarazu*. Queda claro que después de la entrada del núcleo en el citoplasma cortical, una sustancia interacciona con la región de control de *fushi tarazu* y activa o bloquea el gen según la posición del núcleo en el córtex. A su vez, el producto proteínico de *fushi tarazu* puede ir a regular un grupo de otros genes de una manera coordinada con precisión.

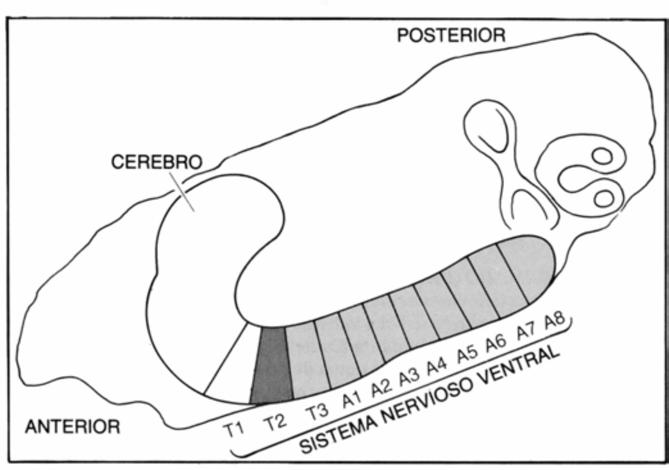
Fushi tarazu es uno más entre los genes cuya expresión se ha investigado por hibridación *in situ*. Otros experimentos han ayudado a esclarecer cómo se completa el plan segmentario. Se sabe que el gen *dentellado* (*engrailed*) es necesario en el compartimiento posterior de cada segmento. La hibrida-



9. SE HA DADO EL NOMBRE DE *DEFORMADO* (*DEFORMED*) a un gen homeótico que parece especificar la identidad de los segmentos cefálicos posteriores en el embrión de *Drosophila*. La fotografía muestra una sección de un embrión poco después de la formación del blastodermo; la región anterior cae en la parte superior izquierda y la posterior en la inferior derecha. La banda brillante señala la posición de los transcritos *Deformado* tal como se detectan en la hibridación *in situ*. En el mapa de destinos, la situación de la banda brillante corresponde a los segmentos cefálicos posteriores. Además, las moscas portadoras de una mutación en el gen *Deformado* tienen defectos en esos segmentos. Parece que el gen *Deformado* de tipo silvestre hace falta para la correcta formación de la región posterior de la cabeza. Muchos datos recientes sugieren que la identidad de los segmentos del cuerpo de la mosca *Drosophila* está especificada por genes homeóticos.

ción *in situ* indica que poco después de que *fushi tarazu* se exprese, los transcritos de *engrailed* se distribuyen según un patrón de 14 franjas estrechas, correspondientes al compartimiento posterior de los segmentos. Por lo que se manifiesta, el embrión se divide primeramente en segmentos que luego se subdividen en compartimientos. El mejor lugar para seguir la acción de los genes homeóticos es el sistema nervioso ventral, que en posteriores fases del desarrollo embrionario forma un ganglio por cada segmento corporal. Empleando la caja homeótica como sonda, se ha clonado una serie de genes homeóticos cuyos transcritos se acumulan en ganglios ventrales consecutivos. Cada gen se expresa con más fuerza en un segmento concreto y con menos fuerza en todos los segmentos posteriores a ése. Eso concuerda con la hipótesis de Lewis, según la cual la actividad de una combinación específica de genes homeóticos determina la identidad de los distintos segmentos.

En la actualidad, se está llevando a cabo en muchos laboratorios una intensa investigación para consolidar y extender los conocimientos obtenidos con la identificación de la caja homeótica. Si el dominio homeótico se fija al ADN, será importante saber dónde y cómo. Además, aunque los genes poseedores de cajas homeóticas regulen la actividad de muchos otros genes, ellos mismos deberán ser regulados a su vez. Desentrañar la regulación de los reguladores constituirá otro paso importante, que podrá además conducir a identificar los factores citoplasmáticos del huevo que proporcionan la información posicional. Todo este trabajo febril marca la frontera entre dos eras. En la era premolecular se avanzó mucho en el conocimiento del momento en que se asignan los destinos a las células embrionarias. En la era molecular, se averiguará cómo ocurre ello. Los mecanismos moleculares subyacentes a dicho desarrollo pueden resultar mucho más universales de lo que se había sospechado.



10. LOS TRANSCRITOS *ANTENNAPEDIA* se acumulan diferencialmente en los segmentos del embrión, como vemos en esta sección de un embrión en las últimas etapas de su desarrollo. En esas fases postreras de las embriogénesis, la segmentación se observa con toda nitidez en el sistema nervioso central, que forma un ganglio por cada segmento corporal. *Antennapedia* se expresa muy poco en el primer ganglio torácico. En cambio, lo hace fuertemente en el segundo ganglio torácico y débilmente en los segmentos siguientes. La expresión diferencial puede ser parte del mecanismo por el cual los genes homeóticos confieren identidades específicas a los segmentos del embrión de *Drosophila melanogaster*.

Base molecular de la evolución

El descubrimiento de que las mutaciones se acumulan en los genes de todos los linajes de plantas y animales a un ritmo regular ha arrojado luz sobre la evolución molecular y orgánica

Allan C. Wilson

Las moléculas de la vida constituyen hoy la principal fuente de nuevos planteamientos sobre la naturaleza del proceso evolutivo. Durante un siglo el conocimiento de la evolución se fundó, sobre todo, en biólogos que trabajaban en el rango de los organismos. Junto a los geólogos, mostraron que los millones de clases de criaturas que medran en la Tierra descienden de unas pocas especies que existieron hace más de mil millones de años. Asimismo, reconocieron que la evolución biológica era el resultado del cambio hereditario hecho posible por las mutaciones y la selección natural. Sin embargo, hasta hace poco, los investigadores eran incapaces de estudiar la evolución en su nivel fundamental. No podían indagar directamente los cambios que tienen lugar en los genes.

Las nuevas técnicas bioquímicas han dado acceso a tal investigación. En las últimas décadas, los biólogos moleculares han conseguido comparar los genes de miles de especies vivas y de unas cuantas especies extintas. Han medido la magnitud de las diferencias entre los genes y han estudiado la naturaleza de las mismas. Uno de los principales resultados de los análisis ha sido la noción de reloj molecular. Puesto que las mutaciones cambian el ADN en todos los linajes a un ritmo muy similar durante largos períodos, puede establecerse una relación precisa entre mutaciones y tiempo transcurrido. Los investigadores han calibrado el reloj fundándose en fósiles datados con exactitud, no muchos ciertamente; éstos permitieron estimar el tiempo transcurrido desde que determinados grupos de especies divergieron a partir de antepasados comunes. Por consiguiente, las diferencias moleculares pueden utilizarse para inferir cuándo acontecieron las bifurcaciones de multitud de otras especies. La biología evolutiva ha comenzado a adquirir un fundamento molecular cuantitativo.

Mi exposición de la base molecular de la evolución se basa en dos supuestos: 1) que las diferencias hereditarias entre organismos son el resultado de diferencias en sus ADN y 2) que los evolucionistas moleculares no sólo deben medir las diferencias en los ADN, sino también explicar el origen de éstas y su relación con las diferencias orgánicas. [Por orgánico entenderemos aquí lo referente al rango de organismo. N. del E.] En este artículo describiré algunas nociones y descubrimientos de la evolución molecular, intentaré relacionarla con la evolución orgánica y defenderé que la biología molecular ha aportado una nueva manera de analizar este último plano de la evolución orgánica. En concreto, sostengo que la presión evolutiva no sólo es resultado de factores externos –piénsese en las alteraciones ambientales– sino también del cerebro de mamíferos y aves: de su poder innovador.

Dos elementos críticos de la evolución molecular son las mutaciones puntiformes (específicamente, las que se producen en los genes codificadores de proteínas) y las mutaciones reguladoras. Una mutación puntiforme consiste en la sustitución de una base del ADN, que puede afectar a la secuencia de aminoácidos de una proteína. A diferencia de ella, una mutación reguladora es cualquier cambio en un gen o en sus proximidades que determina que el gen sea activo o inactivo. La investigación de las mutaciones puntiformes ha traído como resultado la creación del concepto de reloj molecular y el descubrimiento de un tipo de cambio genético conocido por mutación neutra: una mutación que no es ni ventajosa ni perjudicial para un organismo. El estudio de las mutaciones puntiformes también ha iluminado multitud de zonas oscuras de la genealogía y ramificación de las especies. La inclusión de las mutaciones reguladoras ha auspiciado un conocimiento más hondo de la relación entre la evolución molecular y la evolución orgánica.

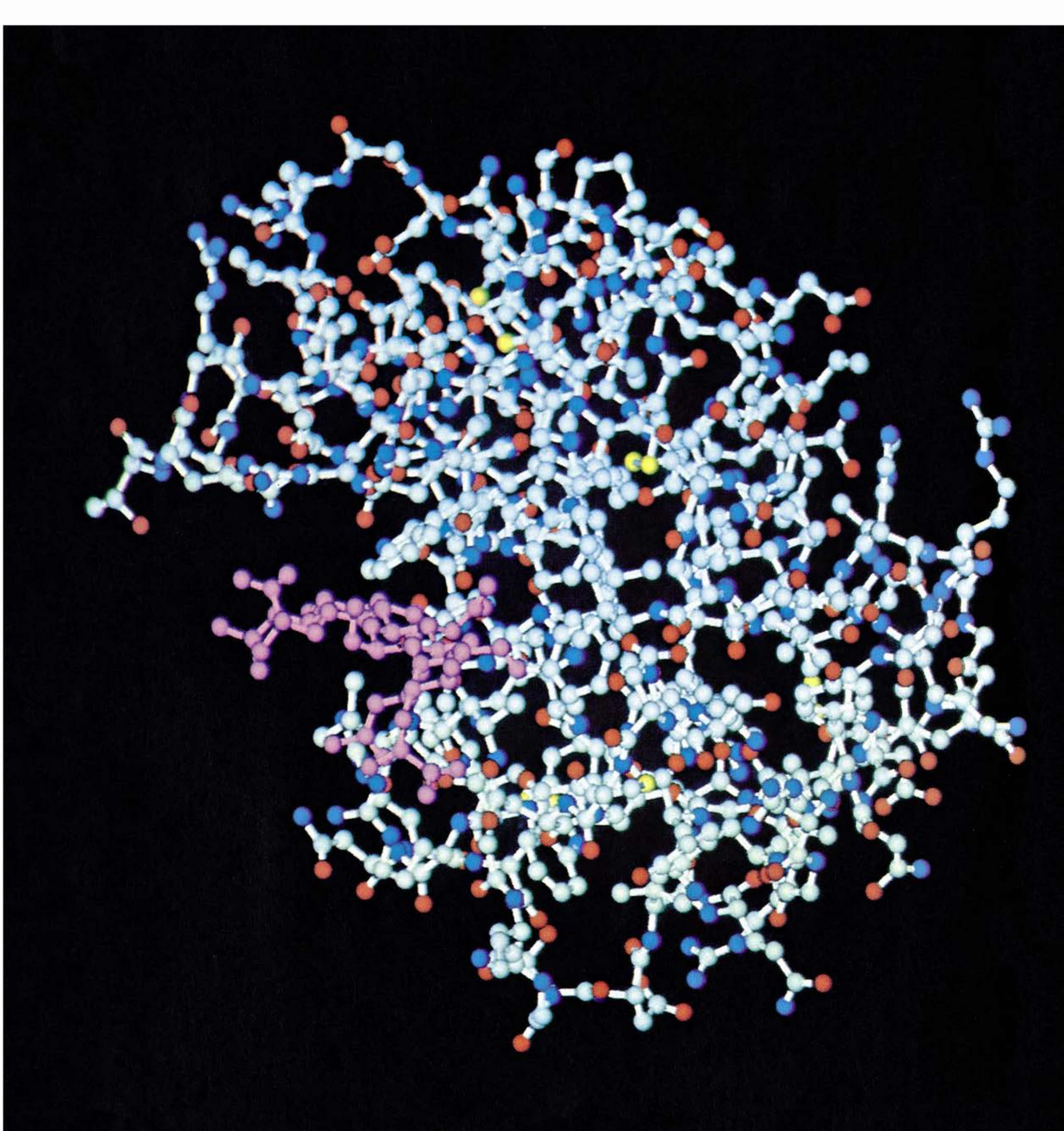
A la hora de examinar mutaciones puntiformes, lo deseable por los biólogos moleculares es comparar directamente las estructuras de los ADN. Sin embargo, antes de que tales comparaciones fueran posibles, los químicos descubrieron el modo de cotejar las estructuras de las proteínas [*véase la figura 2*]. Entre la secuencia de los aminoácidos de una proteína y la secuencia de bases del gen que la codifica hay una relación simple. Concretamente, cada sustitución de un aminoácido en una proteína puede atribuirse a una mutación puntiforme en un gen. Por ende, los investigadores afinaron su visión de la evolución molecular mediante la comparación de secuencias de aminoácidos.

En el transcurso de los estudios comparativos de estructuras proteicas, al-

1. LISOZIMA, enzima representada en el modelo generado por ordenador de la página opuesta. Sirve de medida de las mutaciones reguladoras, que son cambios en el ADN que determinan que los genes sean activos o inactivos. La imagen representa una molécula de lisozima con parte de su sustrato (*púrpura*), la sustancia sobre la que actúa. El sustrato es un azúcar polimérico que se encuentra en la pared celular de las bacterias. La lisozima rompe el polímero y destruye así la pared de la célula bacteriana. Por esta razón ha sido reclutada como una enzima digestiva fundamental por los rumiantes (vacas y ovejas) para recuperar el nitrógeno y el fósforo presentes en las bacterias de su estómago. (Las bacterias actúan en la digestión de la celulosa.) El estómago de la mayor parte del resto de los mamíferos, por otro lado, contiene sólo una baja concentración de lisozima. La diferencia en la concentración de enzima contrasta con su uniformidad funcional: la lisozima de todos los mamíferos actúa de manera casi idéntica. La diferencia en concentración es atribuible fundamentalmente a mutaciones reguladoras, que se cree desempeñan un papel importante en la evolución de los organismos. La imagen de ordenador fue obtenida por Graphics Systems Research Group de IBM, U.K. Ltd. Los átomos de carbono corresponden a las bolas blancas, los de oxígeno a las rojas, los de nitrógeno a las bolas azules y los de azufre a las amarillas; las varillas blancas representan enlaces interatómicos.

gunos autores empezaron a considerar cómo podía relacionarse el número de sustituciones de aminoácidos con el tiempo transcurrido desde que dos especies cualesquiera derivaron de un antepasado común. Contando las sustituciones (y haciendo caso omiso de su naturaleza y localización en la estructura de la proteína) descubrieron que las proteínas se comportaban aproximadamente como relojes evolutivos. Gran cantidad de pruebas abonan la idea de que las sustituciones de aminoácidos se acumulan a un ritmo casi constante en el transcurso de largos períodos de tiempo evolutivo. Las técnicas que permiten el cotejo directo de los genes confirman la hipótesis de que la evolución desarrollada a un ritmo constante de las proteínas está enraizada en la evolución, también a ritmo constante, del ADN. En el ADN nuclear y en el ADN de otros componentes celulares (mitocondrias y cloroplastos), por ejemplo, la acumulación media de sustituciones de bases es casi tan regular como el proceso de la desintegración radiactiva.

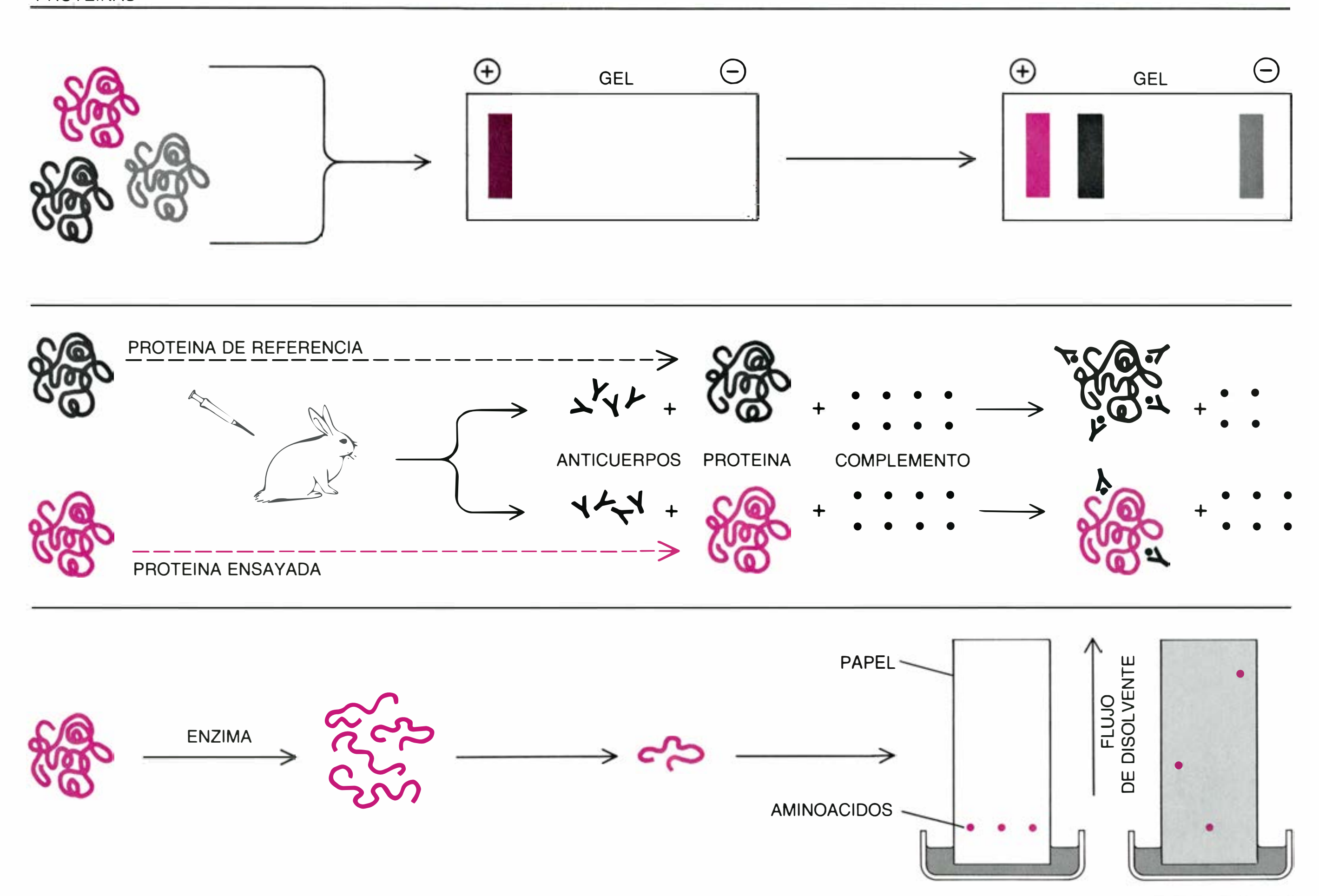
Sin embargo, el reloj molecular no anda a la misma velocidad en todas las regiones de la molécula de ADN. El ritmo de la evolución en una zona de ADN que afecte directamente al funcionamiento de una proteína es lento; es mayor en una posición que no incida



en ese funcionamiento. En otras palabras, el cambio evolutivo en el plano molecular es pausado donde hay una fuerte limitación funcional y más rápido donde ésta es débil. Los centros activos de la mayoría de las enzimas, por ejemplo, evolucionan lentamente en comparación con muchas otras zonas de la estructura enzimática. También ilustran la noción de limitación funcional las estructuras de otras proteínas. Las hemoglobinas de los caballos y las del hombre difieren entre sí en 43 aminoácidos de un total de 287. A pesar de tantas diferencias, los estudios cristalográficos han mostrado que las cadenas aminoacídicas de las dos hemoglobinas se pliegan de manera idéntica. Las dos proteínas también se comportan de modo casi idéntico en las pruebas funcionales: las mutaciones puntiformes atribuibles a las 43 sustituciones están sujetas a limitaciones funcionales débiles.

Un tercer ejemplo de limitación funcional lo proporcionan las comparaciones de codones (tripletes de bases del ADN, cada uno de los cuales especifica un aminoácido determinado). La velocidad de cambio en la tercera posición de los codones es mayor que en la segunda. Observación que se corresponde con este otro hecho: mientras cualquier cambio de base en la segunda posición origina una sustitución aminoacídica, aproximadamente la mitad de los cambios de base en la tercera posición no provocan sustitución alguna. La limitación funcional sobre el cambio evolutivo en la segunda posición es intensa debido a que los cambios que en ella ocurren afectan con mayor probabilidad a la función de las proteínas; la limitación sobre los cambios en la tercera posición es débil, ya que pueden darse cambios en ella que no perturban el funcionamiento de las proteínas.

La comprobación de la alta velocidad de cambio evolutivo en las posiciones de ADN limitadas débilmente ha alentado a los biólogos a ver en la evolución molecular una acumulación de mutaciones neutras que no entorpecen el funcionamiento de las proteínas. Esta forma de considerar la evolución molecular ha resultado incómoda para los darwinistas, acostumbrados a imaginarla como el resultado de la acumulación de mutaciones ventajosas. La reconciliación de los dos puntos de vista llega cuando se afirma que, aun cuando las mutaciones neutras puedan dominar la evolución molecular, la abundancia de variación genética posibilita el acopio de suficientes mutaciones ventajosas para permitir que la



2. PARA MEDIR LA EVOLUCION MOLECULAR se comparan proteínas (*a-c*) o moléculas de ADN (*d-f*). La electroforesis en gel (*a*) separa proteínas en función de la carga. Puesto que la carga varía con la composición en aminoácidos de una proteína, la técnica sirve para calibrar cuánto varía aquella composición en diferentes versiones de una proteína. El método es más valioso cuando las movilidades electroforéticas de una serie de 30 o más clases de proteínas de un individuo se comparan con las movilidades de las correspondientes proteínas de otro individuo. La fijación de microcomplemento (*b*) hace uso de la capacidad de los anticuerpos para detectar pequeñas diferencias entre proteínas. La capacidad de los anticuerpos producidos por conejos inmunizados contra una proteína pura para unirse a la proteína inmunógena y a otras proteínas afines se prueba en presencia de complemento (una mezcla de sustancias de la sangre). El complemento interacciona sólo con el anticuerpo unido a un antígeno proteico. La desaparición del complemento mide la cantidad de complejo antígeno-anticuerpo formado; indica, por tanto, las diferencias entre las proteínas. En la secuenciación química (*c*), una enzima fragmenta una proteína purificada. Los aminoácidos de cada fragmento se separan secuencialmente, comenzando por un extremo del mismo, y se identifican por cromatografía, un proceso en el que

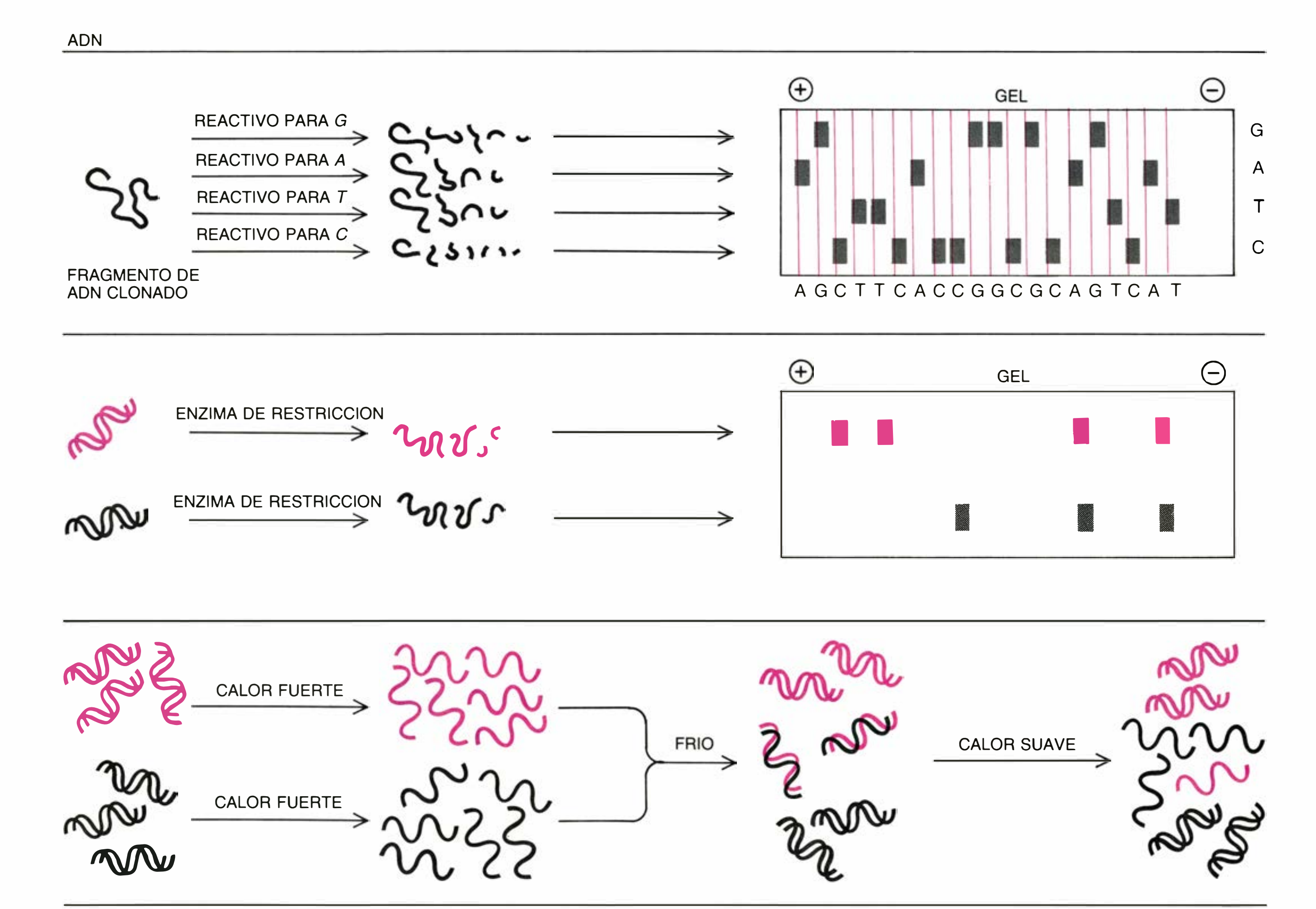
selección natural tenga su influencia en el plano orgánico.

La revolucionaria idea de que el cambio genético está dominado por mutaciones neutras ha ayudado a explicar el descubrimiento de que la evolución molecular depende más de los años que de las generaciones. Si la evolución molecular estuviese impulsada por la selección positiva, cabría esperar encontrarse con mayores velocidades de evolución en especies de corta vida, moscas o ratones por ejemplo, que en las de vida larga, tales como los primates superiores. La realidad es que las sustituciones de bases se acumulan aproximadamente a la misma velocidad en las secuencias codificadoras de ambos tipos de linajes.

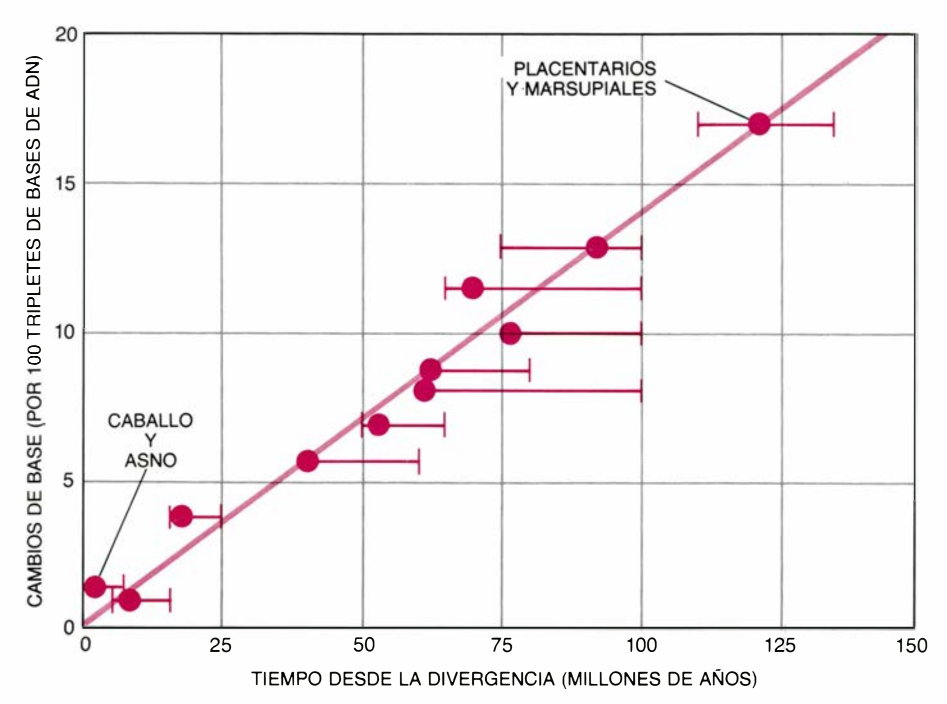
No obstante, muchos biólogos que construyen modelos matemáticos de los procesos evolutivos se inclinan a creer que gran parte de las mutaciones acumuladas a lo largo de la evolución molecular no son neutras. Arguyen que, en vez de transcurrir de manera uniforme, la evolución molecular puede caracterizarse por largos períodos de inactividad interrumpidos por explosiones de cambio. De estar en lo cierto, el reto de encontrar una explicación del fenómeno del reloj molecular se complica. Tal explicación puede traer consigo una comprensión más profunda de la naturaleza del proceso evolutivo.

Hay un punto sobre el que coinciden todos los biólogos moleculares: los cambios en las secuencias de los ADN y de las proteínas que ellos codifican son principalmente divergentes. Por consiguiente, los investigadores pueden construir árboles moleculares, o diagramas arboriformes, en los que se muestran las relaciones genealógicas entre esas secuencias. Tales diagramas le ayudan a uno a imaginar de manera clara y cuantitativa cómo evolucionaron las secuencias contemporáneas a partir de una secuencia ancestral común. Los árboles moleculares también arrojan luz sobre la ruta filogenética por la cual especies con unas secuencias dadas evolucionaron a partir de especies ancestrales comunes. El orden de las bifurcaciones en los linajes que condujeron a las especies modernas provee un valioso armazón en el que organizar los conocimientos de las diferencias entre especies.

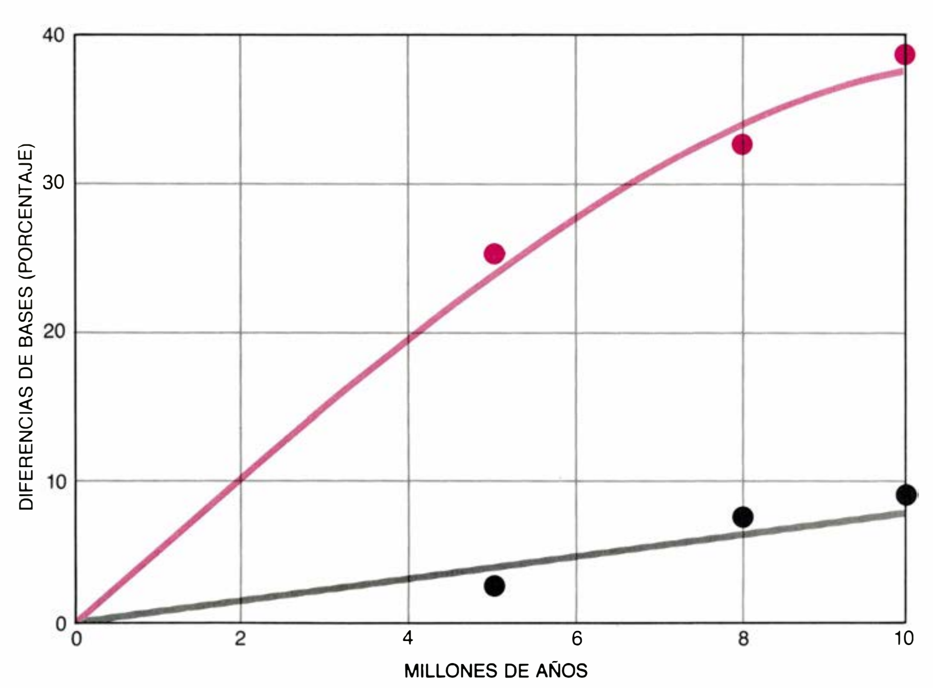
A la hora de elegir entre hipótesis genealógicas alternativas, los biólogos moleculares siguen el principio de la navaja de Occam: entre las teorías en litigio se prefiere la más simple a las



la migración de los aminoácidos depende del tamaño y de la carga. Dos ADN clonados pueden compararse por secuenciación (*d*). Un fragmento de ADN, al que se le ha incorporado un marcaje radiactivo en un extremo, es cortado por un reactivo específico para una de las cuatro bases del ADN (*G*, *A*, *T*, *C*) en condiciones tales que cada molécula se corte por término medio en sólo uno de sus sitios susceptibles. La secuencia del ADN (*AGCTTCACCGGCGCAGTCAT* en este caso) se deduce leyendo las distancias que recorren los fragmentos separados a lo largo de un gel bajo la influencia de un campo eléctrico. Un método más rápido pero menos preciso para comparar los ADN es el análisis de restricción (*e*). Se fragmenta un trozo de ADN con una serie de enzimas de restricción, cada una de las cuales reconoce y corta una secuencia específica de cuatro a seis bases. Las diferencias en las secuencias afectan al tamaño de los fragmentos, por lo que el patrón de fragmentos de dos ADN sometidos a ruptura y electroforesis reflejará su grado de similitud. En la hibridación del ADN (*f*), las dobles hélices de ADN análogos, y de origen distinto, se desenrollan al someterlas a calentamiento. Cuando dos series de monocadenas se enfrían juntas, pueden formarse híbridos bicatenarios constituidos por una cadena de cada uno de los ADN. La estabilidad de los híbridos frente al calor da razón del grado de similitud.



3. EVOLUCION A RITMO CONSTANTE de los genes de mamíferos cuyo momento de divergencia se conoce con cierta seguridad gracias al registro fósil. Se determinó la secuencia aminoacídica de cada una de las siete proteínas en 11 parejas de mamíferos o grupos de éstos y se calculó el número de diferencias en los aminoácidos entre los dos miembros de cada pareja. En el eje vertical se indica el número estimado de mutaciones puntiformes, o sustituciones de bases del ADN, requerido para explicar estas diferencias. El eje horizontal señala el tiempo transcurrido desde que el linaje particular de cada miembro de una pareja divergió del otro. Entre los grupos de mamíferos comparados, los menos relacionados son los placentarios y los marsupiales, cuyo antepasado común vivió hace alrededor de 120 millones de años. La pareja más estrechamente relacionada es la integrada por el caballo y el asno. Los segmentos indican la incertidumbre en las estimaciones de los momentos en que ocurrió la divergencia. La línea muestra que las sustituciones de bases en el ADN se acumulan a velocidades casi invariables, a lo largo de amplios períodos de tiempo evolutivo.



4. LIMITACION FUNCIONAL, ilustrada aquí comparando la velocidad de cambio sufrida en la segunda posición de los codones (*curva negra*) con la velocidad de cambio en la tercera posición (*curva en color*). Se llama codón al triplete de bases del ADN que codifica un aminoácido determinado. El cambio tiene lugar más rápidamente en la tercera posición que en la segunda, por la sencilla razón de que mientras cualquier cambio de base en la segunda posición origina una sustitución aminoacídica, alrededor de la mitad de los cambios de base en la tercera posición no dan lugar a sustitución alguna. Los datos proceden de comparaciones hechas entre ADN de mitocondrias (orgánulos celulares) de antropoides y de hombres. En términos generales, el ritmo de evolución en un sitio de un gen que afecta directamente al funcionamiento de una proteína es bajo; por contra, la velocidad resulta ser mayor en una posición que no afecte a tal funcionamiento.

más complejas. Se escoge así, para explicar la evolución de secuencias particulares a partir de una secuencia ancestral común, el árbol que requiera menor número de mutaciones. Este método permite a los evolucionistas moleculares elegir de forma objetiva y cuantitativa entre árboles alternativos. Por ejemplo, ¿en qué grado está emparentado el hombre con los orangutanes y con los antropoides africanos (chimpancés y gorilas)? Un diagrama arboriforme que ligue a los hombres más estrechamente con los antropoides africanos requiere, para explicar los datos moleculares, postular menos mutaciones que el que suponga a los hombres más próximos a los orangutanes. En otras palabras, un diagrama justifica la diversidad de secuencias observada de un modo mucho más simple que otros, lo que lleva a poder descartar, siguiendo un criterio estadístico, a los más complicados.

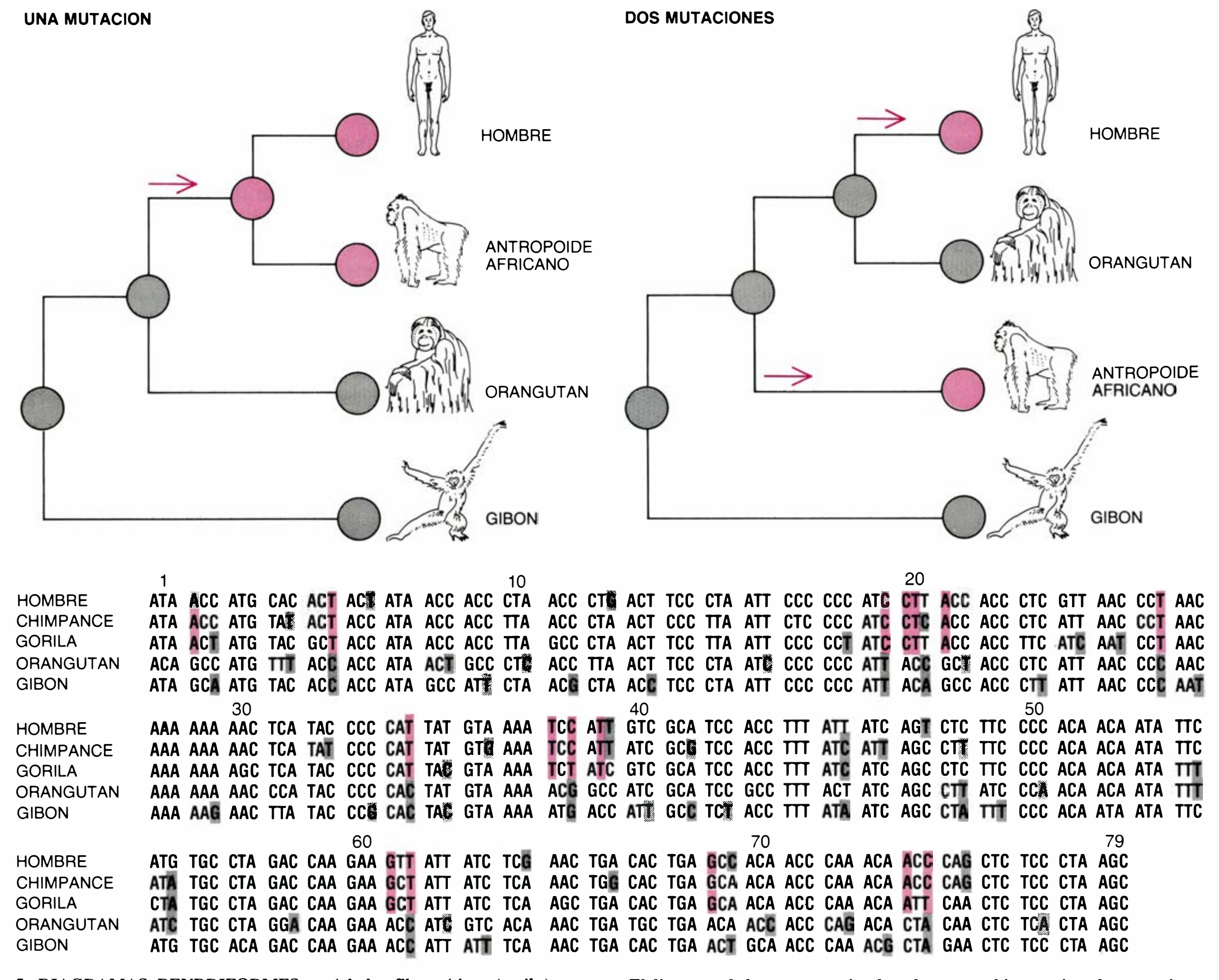
La posibilidad de establecer determinaciones de ese tipo constituye uno de los logros más notables de la biología molecular evolutiva. Antes, los investigadores habían basado los árboles filogenéticos exclusivamente en diferencias de rasgos anatómicos. La comparación de tales rasgos deja ancho margen a criterios subjetivos. Por otra parte, los biólogos no tenían forma de saber el número de mutaciones necesario para generar una diferencia observable en un rasgo. Tampoco podían saber si una mutación que origina la modificación de un rasgo anatómico contribuye también a provocar modificaciones de otros rasgos anatómicos. Los árboles moleculares erigidos con datos de secuencias no reclaman decisiones subjetivas acerca de los rasgos. Además, los biólogos conocen el número mínimo de sustituciones de bases que se precisan para dar cuenta de las diferencias entre las secuencias. Por último, el número de rasgos genéticos numerables, obtenidos mediante comparación de secuencias de ADN y de proteína, ha empezado a sobrepasar al número de rasgos anatómicos disponibles para el análisis genealógico.

Los árboles moleculares no sólo revelan el orden de las bifurcaciones en los linajes, sino que también contienen información sobre el momento en que ocurrieron las divergencias. La primera aplicación de este acercamiento a la datación evolutiva trajo consigo la estima de cuándo divergieron hominoideos como los hombres y los antropoides africanos a partir de un antepasado común. Vincent M. Sarich, en mi labo-

ratorio de la Universidad de California en Berkeley, midió las diferencias estructurales de la albúmina sérica, una proteína presente tanto en el hombre como en los antropoides africanos. Determinó la velocidad media de cambio evolutivo comparando las albúminas de especies de las que se conocía, gracias al registro fósil, la época de su divergencia. De esa manera pudo calcular que el hombre y los antropoides africanos iniciaron caminos distintos hace cinco millones de años. Este tiempo representa sólo una fracción del postulado por los antropólogos: de 20 a 30 millones de años. Los estudios posteriores sobre el ADN han confirmado las conclusiones de Sarich, y han llevado a una reinterpretación del registro fósil y a una revisión de las ideas acerca de la ruta evolutiva que condujo desde el antropoide hasta el hombre.

Los árboles moleculares han permitido aclarar muchas otras relaciones genealógicas entre especies. Los basados en posiciones del ADN de rápida evolución ponen en relación especies que divergieron en época bastante reciente (como los hominoideos). Mientras que esas posiciones facilitan la exploración de las ramas cortas del árbol evolutivo, las posiciones persistentemente conservadas dan acceso al sondeo de las ramas más largas. Los genes que contienen muchas posiciones persistentemente conservadas revelan cuatro ramas principales de descendencia. Las ramas divergieron entre sí hace unos tres mil millones de años, cuando todas las células se encontraban en el nivel de organización bacteriano. El patrón de ramificación ofrece nuevas perspectivas sobre la secuencia de etapas que caracterizaron la evolución del metabolismo en las células primitivas.

Los análisis genealógicos han corroborado también la teoría de que las células eucariotas (las células nucleadas de los organismos superiores a las bacterias) se engendraron merced a la fusión de dos o más tipos de células bacterianas hace unos mil millones de años. Las células eucariotas contienen ADN en varios compartimentos: el núcleo, la mitocondria y, en el caso de las células fotosintéticas, el cloroplasto. El



5. DIAGRAMAS DENDRIFORMES, o árboles filogenéticos (*arriba*), que muestran que la genealogía de los hominoideos puede deducirse a partir de secuencias de ADN del tipo de las ofrecidas abajo. Los discos en color muestran la presencia de una base (o aminoácido) particular en una posición determinada de la secuencia del ADN (o proteína), tanto en hombres como en antropoides africanos (chimpancés y gorilas). Los discos grises indican que en esa posición hay una base (o aminoácido) diferente en orangutanes y gibones (antropoides asiáticos). El diagrama de la parte superior izquierda explica las diferencias entre las secuencias de los hominoideos con una sola mutación en el linaje que lleva al antepasado común del hombre y de los antropoides africanos (*flecha*). El diagrama de la parte superior derecha, en cambio, requiere dos mutaciones (*flechas*) para explicar los datos; es menos probable que sea correcto. El orden en que los hombres divergieron de los chimpancés y de los gorilas sigue siendo objeto de controversia. Los 79 codones mostrados en la parte inferior de la ilustración codifican, en los diversos hominoideos, parte de una proteína (NAD deshidrogenasa 5) que actúa en la producción de energía dentro de la mitocondria. Las secuencias difieren sobre todo por sustituciones de bases en la tercera posición de los codones (*paneles grises*). Los 16 paneles en color indican las posiciones en que la secuencia de los antropoides africanos se asemeja a la humana. (Los árboles moleculares han aclarado muchas relaciones entre especies.)

genoma de cada compartimento engloba una serie de genes muy conservadores que especifican la estructura de las moléculas de ARN de los ribosomas (los orgánulos donde se sintetizan las proteínas) de ese compartimento. Las comparaciones de secuencias muestran que, mientras los genes de ARN ribosómico nuclear derivan de una de las cuatro ramas primarias del árbol bacteriano, los genes del cloroplasto y de la mitocondria derivan de otra.

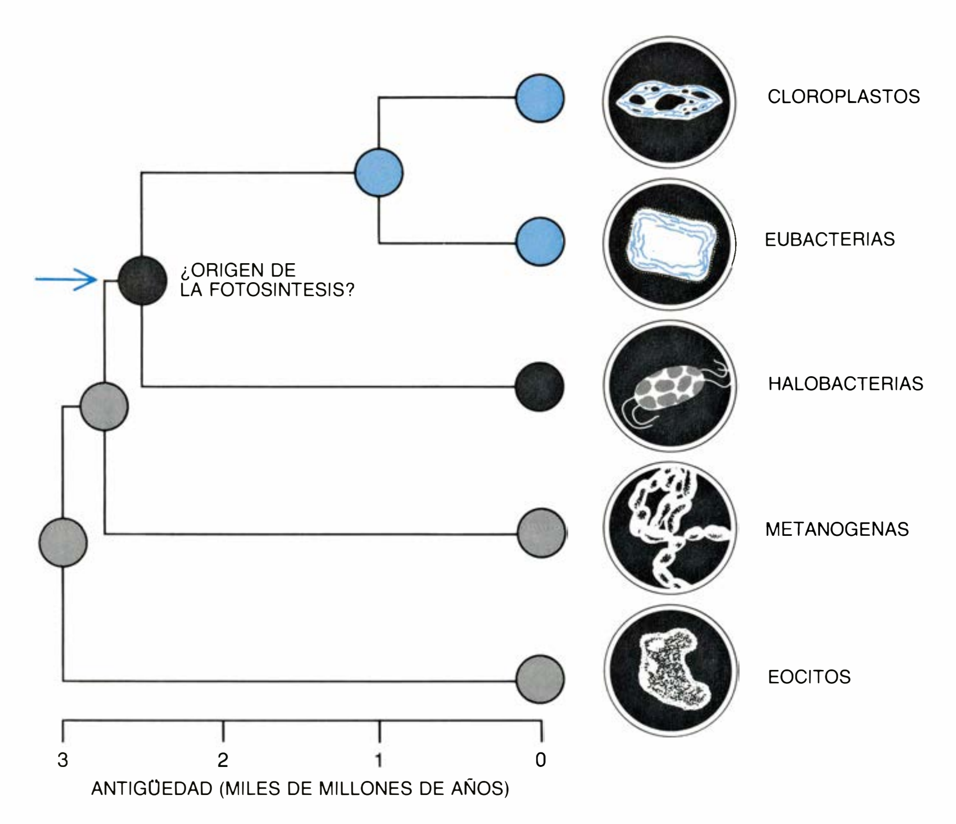
El análisis genealógico ha ayudado asimismo a explicar cómo el genoma nuclear de las células eucariotas se ha hecho cientos de veces mayor que el genoma bacteriano. El patrón de relaciones genealógicas entre genes y algunas secuencias repetitivas del núcleo ofrece claves de las etapas implicadas en el proceso. Estas etapas incluyen la duplicación de genes enteros y su movimiento hacia nuevas localizaciones en el genoma. Los genes duplicados divergen por lo general independientemente, bien adquiriendo nuevas funciones, bien convirtiéndose en pseudogenes inactivos: trozos duplicados de ADN que contienen mutaciones que les impiden codificar un polipéptido, o una corta cadena proteica, funcional. En otros casos, los ADN duplicados se comunican (intercambian información genética) en diverso grado con algún otro ADN a medida que evolucionan.

Por otro lado, los análisis genealógicos han contribuido al conocimiento del papel evolutivo de la transferencia genética entre especies que no se cruzan. Algunos virus y plásmidos (pequeños círculos de ADN bacteriano) pueden transferir genes celulares de una especie a otra, pero la integración estable de tales genes de una especie en el genoma de otra es rara en la naturaleza. Si fuese frecuente, el genoma de cada especie sería un mosaico constituido, sobre todo, por contribuciones transferidas horizontalmente por diversas especies. En ese caso los intentos de fabricar un árbol genealógico para una serie de especies resultarían vanos: un árbol basado en un gen particular discreparía probablemente de otro árbol fundado en un gen distinto. En la práctica, sin embargo, los árboles obtenidos con genes diferentes coinciden entre sí. Los ejemplos más significados de transferencia horizontal no reciben apoyo del análisis genealógico. Tanto en el mundo bacteriano como en el eucariota el modo de evolución predominante ha sido vertical: de padres a hijos.

Aunque la investigación de las mutaciones puntiformes ha dilatado el conocimiento de los procesos evolutivos, no ha conseguido describir completamente la relación entre la evolución molecular y la orgánica. La clara diferencia entre los ritmos de evolución orgánica de dos grupos de especies, por ejemplo mamíferos (gatos, murciélagos, ballenas, hombres, etcétera) y ranas, no refleja la similitud en las velocidades con que se han acumulado las mutaciones puntiformes en ambos grupos. Las ranas son un grupo antiguo de animales que comprende miles de especies. No obstante, comparten tantas semejanzas anatómicas que los zoólogos clasifican todas las ranas en un solo orden. De hecho, durante el período que vio el florecimiento de los gatos, murciélagos, ballenas y hombres a partir de un antepasado común, evolucionó un tipo de rana tan lentamente que los fósiles de hace 90 millones de años y los representantes contemporáneos de su línea evolutiva se clasifican en el mismo género, *Xenopus*. Los mamíferos placentarios, en cambio, a pesar de que se piensa que son un grupo más joven, difieren tanto entre sí que los zoólogos los clasifican en 16 órdenes.

Hechos de este tipo indican que el cambio orgánico ha ido a un paso mucho más rápido en los mamíferos que en las ranas. Pero las mutaciones puntiformes se acumulan en el ADN de mamíferos a la misma velocidad que en las ranas. Una discrepancia similar entre la velocidad a la que se acumulan las mutaciones puntiformes y la velocidad de evolución orgánica caracteriza a muchos otros grupos.

El argumento de que existe un contraste entre la velocidad de acumulación de mutaciones puntiformes y la velocidad de evolución orgánica se basa en la suposición de que las clasificaciones taxonómicas resumen, con imparcialidad, la información sobre el grado de similitud anatómica entre las especies. Para evaluar la validez de esta suposición, Lorraine M. Cherry, a la sazón en la Universidad de California en Berkeley, y Susan M. Case, de la Universidad de Harvard, colaboraron conmigo en el desarrollo de un método cuantitativo y objetivo para estimar el grado en que difieren las especies en su plano corporal [*véase la figura 7*]. Los

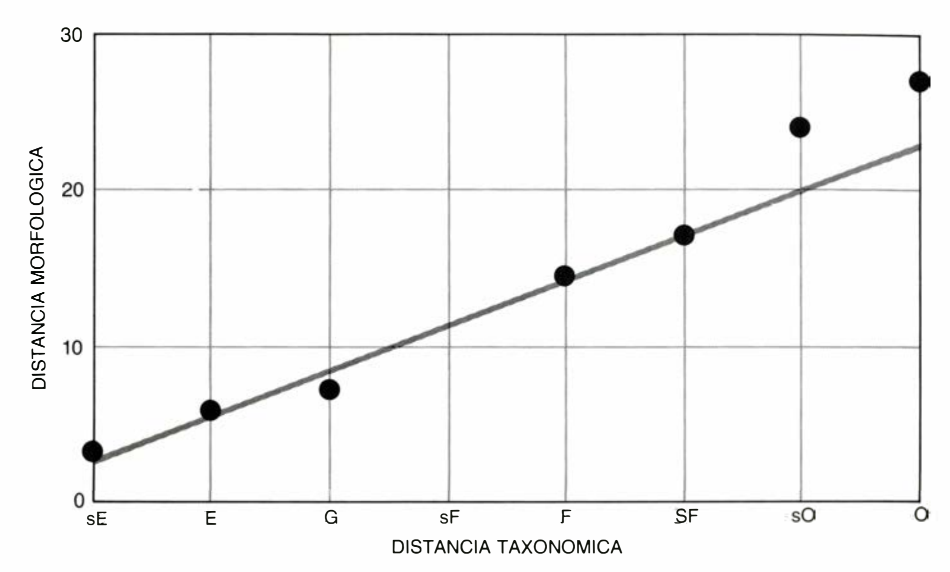


6. EVOLUCION DE LAS CELULAS PRIMITIVAS, iniciada hace unos tres mil millones de años. Condujo a la emergencia de cloroplastos (orgánulos en los que tiene lugar la fotosíntesis) y cuatro grupos iniciales de bacterias: eubacterias (mayoritarias en la actualidad) y halobacterias, metanógenas y eocitos (bacterias dependientes de azufre). Los cloroplastos comparten con muchas eubacterias la capacidad para la fotosíntesis basada en la clorofila y en los carotenoides. Las halobacterias exhiben también un tipo de fotosíntesis basado en un carotenoide. La fotosíntesis se originó quizás en un antecesor común (*flecha*) de cloroplastos, eubacterias y halobacterias. El árbol filogenético se dedujo comparando la secuencia de bases del ARN ribosómico.

resultados de nuestro método coinciden con los obtenidos según los métodos taxonómicos tradicionales.

El trabajo de Cherry y Case presta fundamento cuantitativo a la noción de que la acumulación de mutaciones puntiformes no puede explicar la acelerada tasa de evolución orgánica de los mamíferos. El reconocimiento de esta discrepancia ha empujado a los biólogos moleculares a plantearse dos cuestiones: ¿Qué relación existe entre evolución molecular y evolución en niveles superiores de organización orgánica? ¿Qué determina que los mamíferos evolucionen tan rápidamente en estos niveles superiores?

Una posible respuesta a la primera pregunta es que la mayoría de las mutaciones puntiformes que se acumulan en los ácidos nucleicos y en las proteínas codificadas por éstos deben ser neutras o casi neutras desde el punto de vista de la selección natural. Sólo una pequeña parte serviría de base para la evolución adaptativa en el nivel de organismo. La fracción de mutaciones acumuladas con valor adaptativo podría ser superior para los mamíferos que para las ranas, pero con todo resultaría demasiado baja para contribuir significativamente a la velocidad global de evolución molecular de los mamíferos.



7. CON LA DISTANCIA MORFOLOGICA se mide el grado en que los animales difieren en el plano corporal; se correlaciona con la distancia en la clasificación taxonómica. La gráfica resume los resultados de más de 20.000 mediciones anatómicas en cerca de 400 especies y sugiere que la acumulación de mutaciones puntiformes no puede explicar la velocidad acelerada de la evolución orgánica en los mamíferos. Para estimar la distancia morfológica entre dos animales, se mide una serie estándar de huesos de la cabeza, extremidades anteriores, tronco y extremidades posteriores de cada animal. La longitud relativa de cada rasgo se calcula entonces dividiendo la longitud de dicho rasgo por la suma de las longitudes de todos los rasgos medidos en el animal. La distancia morfológica entre dos animales es la suma de los valores absolutos de las diferencias entre las longitudes relativas de todos los ragos. Las distancias taxonómicas más pequeñas en la clasificación son las que existen entre subespecies (*sE*), seguidas por las que existen entre especies (*E*), géneros (*G*), subfamilias (*sF*), familias (*F*), superfamilias (*SF*) y subórdenes (*sO*). Las distancias taxonómicas mayores son las que hay entre los diferentes órdenes (*O*). Los puntos representan las principales distancias morfológicas entre aves. Se ajustó una línea con análogos valores de distancias para ranas, lagartos y mamíferos.

Pero son las mutaciones reguladoras, con toda probabilidad, las que establecen el enlace entre la evolución molecular y la evolución orgánica. Una mutación reguladora es cualquier mutación que afecta a la expresión de un gen, particularmente a la activación o inactivación de genes específicos en el curso del desarrollo. En concreto, se ha prestado atención a la idea de que la mayor parte de la evolución adaptativa en un nivel orgánico débese a mutaciones que alteran la concentración relativa de proteínas específicas más que a mutaciones que afectan a sus estructuras.

Para contrastar estas ideas se necesita una estrategia en la elección de los genes con los que ligar el cambio molecular con el cambio orgánico. Hasta que no se conozcan mejor las bases moleculares del desarrollo embrionario, no parece que sea de utilidad buscar aquellos genes cuyas diferencias den cuenta de las diferencias anatómicas entre especies de organismos multicelulares. La mejor estrategia hoy por hoy es trabajar en la interfase química entre organismo y entorno. Por esta razón, Deborah E. Dobson, Caro-Beth Stewart, R. Tyler White, Michael S. Hammer y Ellen M. Prager, investigadores de mi laboratorio, han estudiado genes que codifican enzimas del intestino de mamíferos. La bioquímica y la fisiología digestiva de los mamíferos son temas bien conocidos. Las especies de mamíferos divergen rápidamente entre sí en lo que respecta a sus dietas. Los bioquímicos pueden adivinar a menudo qué enzimas se necesitan para hacer frente a un compuesto presente en una dieta, pero ausente en otra. Los genes que codifican tales enzimas encierran, por tanto, una clave para conocer la relación entre la evolución molecular y la orgánica.

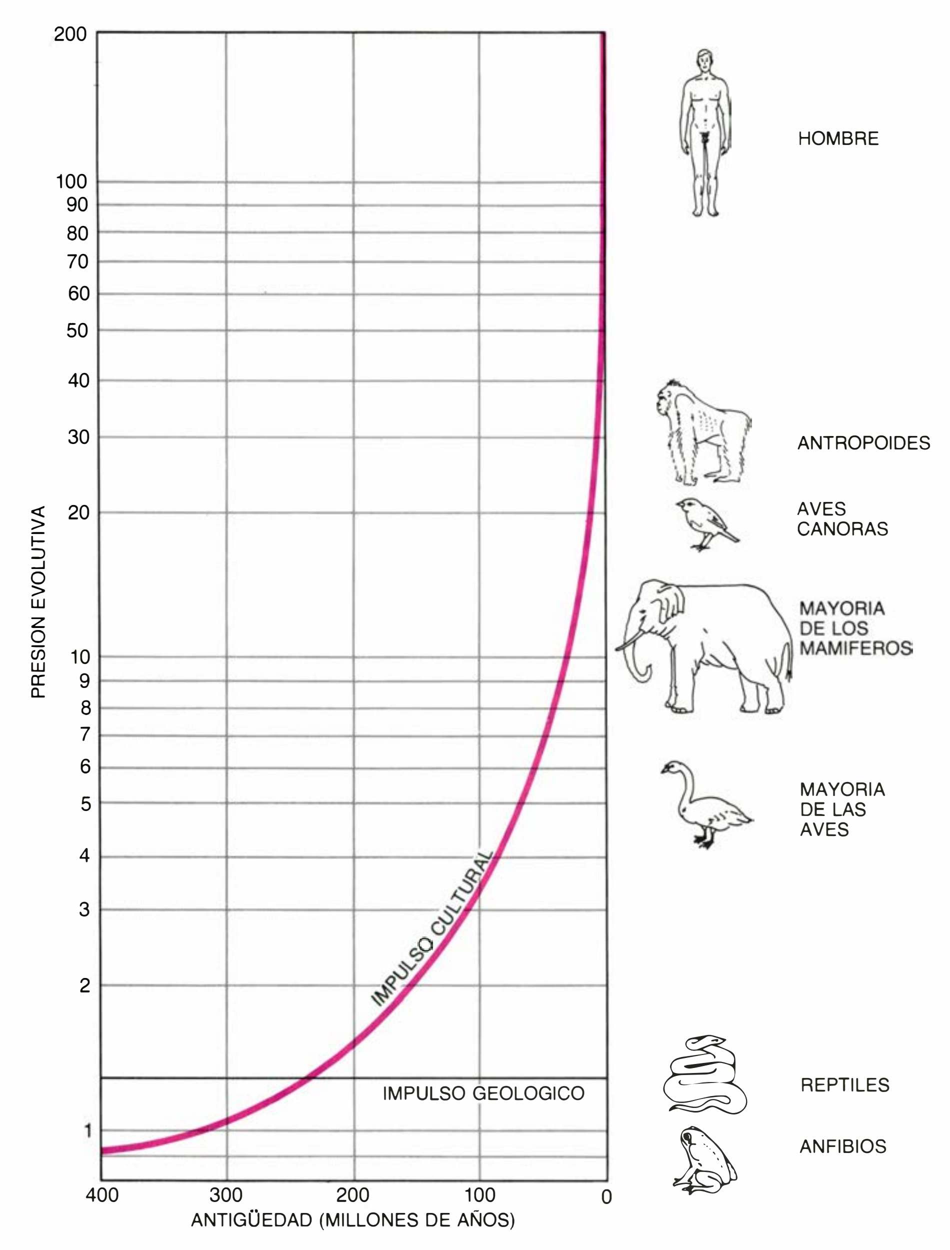
La investigación de las enzimas para digerir bacterias confirma la significación de las mutaciones reguladoras. Aunque la mayoría de los mamíferos no están equipados enzimáticamente para digerir bacterias, en algunas ocasiones, a lo largo de la evolución, especies de aquéllos han adquirido las enzimas precisas. Animales rumiantes, vacas y ovejas, por ejemplo, necesitan digerir bacterias para recuperar el nitrógeno y el fósforo que ha sido capturado por los microorganismos. (Las bacterias actúan en la digestión de la celulosa.) La elevada capacidad para digerir bacterias se debe a la presencia de la enzima lisozima, que abre con un corte la pared celular bacteriana. El estómago de los rumiantes contiene altas concentraciones de lisozima, mientras que la mayor parte del resto de los estómagos de mamíferos posee bajas concentraciones de la enzima. Evidentemente, la lisozima ha sido reclutada en los rumiantes como una enzima digestiva fundamental.

Aunque el abastecimiento de lisozima depende de mutaciones reguladoras y de mutaciones estructurales, los cambios reguladores parecen haber desempeñado el papel principal. Una imagen similar emerge de los estudios sobre evolución en el tubo de ensayo. La conclusión neta de multitud de estudios experimentales sobre evolución con cultivos de bacterias y de células animales es que las mutaciones reguladoras pueden representar un papel primario en la evolución adaptativa.

El tipo específico de mutación reguladora permanece, no obstante, desconocido en la mayoría de los procesos evolutivos. Aunque las duplicaciones génicas y las mutaciones puntiformes en el ADN regulador son responsables de la mayoría de las alteraciones en la velocidad de síntesis de proteínas observadas en experimentos de laboratorio, no pueden explicar, por ejemplo, los cambios de los niveles de lisozima en la evolución de los mamíferos. Como los cambios de la lisozima son específicos de tejido, quizá se demues-



8. LA PRESION EVOLUTIVA, procede de las fuerzas geológicas –así la erosión y la formación de montañas– y del cerebro de mamíferos y aves. Mediante la súbita explotación del ambiente de un modo nuevo, una especie de cerebro relativamente grande se somete a sí misma a nuevas presiones selectivas que propician la "fijación" de mutaciones complementarias al nuevo hábito. Se dice que una mutación se fija cuando los descendientes que poseen el gen mutante predominan sobre los individuos portadores del gen original.



9. AUMENTO DEL TAMAÑO CEREBRAL en relación con el tamaño corporal. Dicha relación abona la teoría de que la alta presión selectiva en los mamíferos proviene del cerebro. Se postula que hubo un aumento drástico de la presión evolutiva en el nivel orgánico en los linajes que condujeron de los anfibios primitivos a las especies contemporáneas de aves y mamíferos. El eje vertical representa una medida de la presión evolutiva. La curva correspondiente al impulso cultural se determinó dividiendo la masa cerebral (en gramos) de una especie por la masa total de su cuerpo (en kilogramos) elevada a dos tercios. El nivel de la línea que describe el impulso geológico se basa en la suposición de que la presión procedente de cambios geológicos no experimentó un incremento neto en los últimos 400 millones de años. Puesto que los hombres, antropoides y aves canoras tienen cerebros relativamente grandes, se encuentran bajo una presión evolutiva más intensa que la mayor parte de los mamíferos, aves, reptiles y anfibios. (Ilustración diseñada por Joan Starwood.)

tre que los potenciadores (secuencias de ADN regulador reconocidas por factores específicos de un tejido dado) son responsables del control de los niveles de la enzima. La activación histoespecífica de un gen puede verificarse por el movimiento de un potenciador hacia una cualquiera entre múltiples posiciones no codificadoras dentro del gen o cerca del mismo. Queda por ver si el abastecimiento de lisozima depende de potenciadores y si el caso de la lisozima ejemplifica el de otros genes que toman parte en los principales cambios adaptativos.

La última cuestión que trataré es la de por qué los mamíferos evolucionan con tanta rapidez en el plano orgánico. Yo sostengo que la alta velocidad evolutiva de los mamíferos con respecto a las ranas debe ser consecuencia del gran cerebro de aquéllos. Un gran cerebro genera una presión evolutiva interna de la que carecen las ranas. Al llegar a esta conclusión doy por sentado que la evolución orgánica es un proceso darwiniano mediado por la selección y que tiene, por tanto, dos componentes: mutación y fijación. En otras palabras, aunque una mutación recién aparecida esté presente inicialmente en un individuo de una población, la mutación no quedará "fijada" hasta que los descendientes portadores del gen mutante predominen claramente sobre los individuos portadores del tipo de gen original. Cuantitativamente, la ecuación fundamental de la evolución establece que la velocidad evolutiva dentro de una población es igual al número de mutaciones aparecidas por unidad de tiempo multiplicado por la fracción de estas mutaciones destinadas a fijarse.

La alta velocidad evolutiva de los mamíferos puede atribuirse, pues, a un gran número de mutaciones, a una gran fracción de fijación o a ambos. Aun cuando resulte factible que el genoma de mamíferos sea más propenso a la mutación, o más inestable, que los genomas de los "fósiles vivientes" (tales como *Xenopus*), parece más probable que sea una gran fracción de fijación la que dé cuenta de la tendencia. Me atengo, en particular, a la posiblidad siguiente: el número de mutaciones aparecidas por unidad de tiempo es el mismo en las ranas y en los mamíferos, pero la fracción de esas mutaciones que acaba fijándose es superior en los mamíferos que en las ranas. Lo cual significaría que los mamíferos fijan una fracción mayor de sus mutaciones morfológicas que las ranas.

La oportunidad de fijar mutaciones ventajosas se presenta cada vez que cambia la dirección de la selección. Hay dos fuentes básicas de cambio en la dirección de la selección, lo que equivale a decir que hay dos presiones fundamentales para evolucionar adaptativamente. Una procede del exterior de la especie y la otra del interior. Los biólogos evolucionistas han propendido a pensar sólo en los factores externos, del tipo de las modificaciones ambientales desencadenadas principalmente por fuerzas geológicas, como la erosión y la formación de montañas. La segunda presión evolutiva proviene del cerebro de los mamíferos y las aves. Esta presión interna, consecuencia del poder del cerebro para innovar e imitar, lleva a la evolución impulsada culturalmente.

Una vez que una especie posee una capacidad evolutiva dual, puede aparecer una nueva manera de explotar el entorno en un individuo y propagarse rápidamente a otros mediante aprendizaje imitativo. Gracias a la súbita explotación del entorno de un nuevo modo, una especie de gran tamaño cerebral relativo rápidamente se expone a sí misma a nuevas presiones selectivas que favorecen la fijación de mutaciones coherentes con el nuevo hábito. Cuanto mayor es la población a la que se comunica el nuevo hábito, más probable es que tal mutación esté ya disponible o pueda aparecer, de manera que la selección actúe sobre ella. El tiempo que requiere una población para fijar una mutación que se complemente con un nuevo comportamiento es más breve si este nuevo comportamiento se propaga con rapidez no sólo hacia la descendencia (verticalmente), sino también hacia otros miembros de la población (horizontalmente).

El linaje que condujo a la especie humana ha estado sometido a la más intensa presión evolutiva interna. El advenimiento de la agricultura, por ejemplo, impuso nuevas presiones selectivas que indujeron rápidos cambios genéticos en las poblaciones humanas. Considérese la introducción del azúcar de leche (lactosa) en la dieta de los adultos como resultado de la invención y propagación social de las granjas productoras de leche. La capacidad genética de los adultos para digerir ese azúcar no ha evolucionado más que en las poblaciones dependientes de productos lácteos. En el corto intervalo de 5000 años, los genes que confieren a los adultos la capacidad para aprovechar el azúcar de leche alcanzaron un nivel del



10. EL HERRERILLO COMUN, un ave canora, se posa en una botella de leche tras perforar a picotazos el tapón de laminilla. En los años treinta y cuarenta, el hábito de abrir botellas de leche se propagó entre la población de herrerillos de Gran Bretaña, proporcionando el más célebre caso de cambio cultural en organismos no humanos. Los hombres detuvieron finalmente el hábito colocando las botellas de leche en embalajes. Los biólogos no llegaron a disfrutar de la oportunidad de averiguar si la población de los pájaros habría respondido genéticamente o no a las nuevas presiones selectivas generadas por su comportamiento.

90 por ciento en las poblaciones que dependían en gran medida de las explotaciones lecheras. Por el contrario, el nivel de los genes es casi nulo en las poblaciones humanas que no beben leche y en todas las demás especies de mamíferos ensayadas.

El potencial de la evolución impulsada culturalmente no queda circunscrito de ninguna manera al hombre. El aprendizaje imitativo se ejerce en muchas especies con cerebros grandes en relación a su tamaño corporal, tales como los primates y las aves canoras. El aprendizaje imitativo también puede ocurrir en algunos peces, calamares e insectos, aunque en estos animales aún no ha quedado demostrado. El caso más célebre de un rápido cambio en un comportamiento no humano lo protagonizaron los pájaros cantores conocidos como herrerillos comunes ("British tits"). Algunos de estos pájaros, que se parecen a los paros americanos, aprendieron a abrir botellas de leche. Pronto les imitaron millones de otros herrerillos. En un par de décadas, la mayoría de los herrerillos estaban aplicados en la tarea. Finalmente los hombres detuvieron el experimento evolutivo: colocaron las botellas en embalajes. Los biólogos perdieron así la oportunidad de averiguar si la población de los pájaros respondía genéticamente o no a las nuevas presiones selectivas generadas por su nuevo comportamiento.

Mi trabajo con Jeff S. Wyles, de Berkeley, y Joseph G. Kunkel, de la Universidad de Massachusetts en Amherst, apoya la hipótesis de que el cerebro de los mamíferos y de las aves supone la mayor fuerza impulsora de su evolución orgánica. Los investigadores hallaron que cuanto mayor es el tamaño del cerebro en relación al del cuerpo, mayor es la velocidad media de evolución anatómica. Durante la evolución de los vertebrados en tierra, el tamaño relativo del cerebro se ha centuplicado a lo largo del linaje que condujo desde los primeros anfibios hasta el hombre. Además, la velocidad del incremento en tamaño relativo se ha acelerado. Los linajes que desde aquellos mismos primeros anfibios condujeron a otros mamíferos y a las aves exhiben una tendencia similar, aunque menos pronunciada, hacia el aumento del tamaño relativo del cerebro en el transcurso del tiempo. Por el contrario, el tamaño cerebral relativo de las ranas y salamandras modernas no difiere significativamente del tamaño cerebral relativo de los primeros anfibios.

Dado que la velocidad de evolución orgánica se correlaciona con el tamaño cerebral relativo, tal velocidad puede también haberse multiplicado por un factor de alrededor de 100 a lo largo del linaje que condujo al hombre, y por factores más pequeños a lo largo de los linajes que desembocaron en otras criaturas de cerebro grande. La evolución orgánica de los vertebrados puede brindar un ejemplo de proceso autocatalítico mediado por el cerebro: cuanto mayor su cerebro, mayor el poder de las especies para evolucionar desde el punto de vista biológico. No obstante, cuando la evolución cultural se hace extremadamente rápida, el proceso presumiblemente no se mantiene acelerado. En ese caso, las presiones generadas por un cambio cultural se verán a menudo mitigadas por el cambio cultural siguiente, más que por una respuesta genética. Probablemente ha sido esto lo que ha ocurrido con la especie humana durante unos 35.000 años, desde que el cerebro del hombre alcanzó su tamaño actual.

El estudio de la evolución molecular ocupa una posición especial en la biología contemporánea; al intentar ligar el gen al organismo, involucra a la biología molecular, biología celular, biología del desarrollo, fisiología, anatomía y biología del comportamiento. También exige un conocimiento de cómo se comportan los genes en las poblaciones, y pone en juego la taxonomía, paleontología y geología. Ningún otro tema afecta a todos estos aspectos de la biología y la geología. El estudio de la evolución molecular ofrece la oportunidad de tender puentes entre disciplinas biológicas y por ello contribuye a la unificación de las ciencias de la vida.

Juegos de ordenador

Los desconcertantes cardos de Bill, la cornupia de Coffin y el enigma de Engel

A. K. Dewdney

La preparación de programas de ordenador que ayuden a diseñar rompecabezas no es menos difícil ni menos interesante que la confección de programas capaces de resolverlos. Bill Cutler, de Wausau, Wisconsin, y Stewart T. Coffin, de Lincoln, Massachusetts, sin duda estarán de acuerdo. Con la ayuda de un ordenador, Cutler ha diseñado un rompecabezas tridimensional, compuesto por seis piezas, que ha llamado "el desconcertante cardo de Bill". Los rompecabezas de tipo cardo, a causa de sus muchas piezas prominentes y de las relaciones de trabazón que se dan entre ellas, recuerdan a un cardo borriquero, y pueden quedar prendidas durante días en quienes intenten resolverlos. El cardo de Bill consta de seis piezas, dispuestas por parejas según las tres direcciones ortogonales [*véase la figura 1*]. En realidad se trata de dos rompecabezas en uno, pues igual desafío supone desmontarlo que volverlo a ensamblar. Ayudándose de dos programas de ordenador para evaluar el potencial problemístico correspondiente a una combinación de las piezas, Cutler ha conseguido el que pueda ser más difícil cardo de seis piezas existente.

Coffin y su ordenador han diseñado un rompecabezas bidimensional, compuesto por hexominós. Los hexominós son piezas planas de diversas formas, de seis cuadrados iguales cada una, pegados por los costados unos a otros. Según la perspicacia con que se elijan esas piezas, la tarea de ensamblar hexominós y de acoplarlos de modo que compongan un gran cuadrado puede resultarle a quien lo intente tan difícil como exasperante. El programa de Coffin va revisando posibles combinaciones de hexominós capaces de generar rompecabezas de especial dificultad. El programa ha descubierto tantas configuraciones que Coffin está dispuesto a enviar un rompecabezas de hexominós, que sea modelo exclusivo, a todo lector que se lo solicite. Semejante munificiencia ha sido la causa de que Coffin bautizase a su programa auxiliar con el nombre de "cornucopia". En lo que a mí respecta, me ha tocado en suerte el rompecabezas que vemos en la segunda figura.

El tercero de los rompecabezas que voy a comentar lo ideó por completo un humano, Douglas A. Engel, de Englewood, Colorado. Lanzamos aquí el guante, por si algún osado aventurero de la algorítmica quiere recogerlo. El rompecabezas de Engel consiste en un mosaico de inocente aspecto, compuesto por piezas de plástico coloreadas circunscritas por dos círculos [*véase la figura 3*]. Sus piezas se denominan huesos y piedras. Girando primero uno de los círculos y después el otro, piedras y huesos quedan pavorosamente entremezclados. Devolverlos a su disposición primitiva parece ser, punto por punto, tan difícil como resolver el cubo de Rubik, restaurando en cada una de sus caras el mismo estado de incitante monocromía inicial.

Como veremos, el rompecabezas de Engel es, sustancialmente, unidimensional. El de Coffin es sin duda alguna bidimensional, y el de Cutler ocupa tres dimensiones en su más estricto sentido. Comenzaremos por las tres dimensiones, y descenderemos hasta una.

¿Algún lector de esta revista no ha tenido jamás entre las manos un rompecabezas "cardo"? A veces se les llama rompecabezas chinos, no obstante ser casi seguro que su origen es occidental. Los cardos pueden componerse de multitud de piezas, y presentarse en multitud de formas. Lo más corriente es que consten de seis, cada una de las cuales es una pieza prismática oblonga, provista de muescas o escotaduras. Al montarlo, las piezas quedan dispuestas en tres parejas. Una pareja la forman dos tacos adyacentes, que parecen hundirse en el centro del rompecabezas y emerger, intactos, por el otro lado. Empero, es imposible que el centro del cardo pueda estar simultáneamente ocupado por las tres parejas. Las escotaduras resuelven la paradoja. También definen las posibilidades de montaje y de desarmado. Evidentemente, el arte de diseñar un cardo de seis piezas reside en determinar las escotaduras que deben tallarse en cada una de ellas.

Para diseñar cardos, Cutler procede en tres etapas. En la primera elige las seis piezas a utilizar. Seguidamente, se asegura de que las escotaduras sean mutuamente compatibles. Ello supone determinar si existe una disposición en la cual las piezas encajen perfecta y ajustadamente en el volumen central del rompecabezas. Finalmente, ensaya si es posible desmontarlo. ¿Se podrá desarmar el rompecabezas y, si es así, con qué dificultad? Cutler confía a un ordenador las dos últimas etapas del diseño.

Cada pieza del rompecabezas cardo nace a la vida en forma de prisma cuadrado de madera de proporciones fijas. En el rompecabezas conocido por "desconcertante cardo de Bill", cada pieza mide 2 × 2 × 6 (en unidades arbitrarias). Hay en estos tacos 12 potenciales lugares donde tallar las escotaduras [*véase la figura 1*]. Si imaginamos que el taco está compuesto por 24 cubitos unitarios, habría cuatro cubitos en cada punta de la pieza y 16 en el centro. En una cara del taco vemos ocho cubitos centrales dispuestos en formación de dos hileras de cuatro. Se numeran esos cubitos de 1 a 8. En la cara opuesta del taco hay cuatro cubitos más, numerados de 9 a 12. El taco se convierte en pieza potencial de un cardo al extraer de él un subconjunto de estos 12 cubos. De las 4096 maneras de elegir los posibles subconjuntos, Cutler estima que sólo 396 producen piezas útiles para rompecabezas.

Su larga experiencia con rompecabezas de tipo cardo permite a Cutler seleccionar seis piezas prometedoras. Mas, ¿cómo averiguar si las seis piezas llegarán realmente a encajar, sin tener que llevar a cabo la penosa construcción de un modelo material, en madera? No tardó mucho Cutler en valerse de un ordenador para asignarle esta fase de proceso de diseño. En 1973 escribió su primer programa de análisis de configuraciones. El programa representa el espacio que ha de ocupar el rompecabezas mediante una tabla, o formación matricial tridimensional, que mide 8 × 8 × 8. Cada uno de los elementos, o casillas, de esa matriz representa un cubo unitario situado en su posición; la casilla o cubículo estará rotulada con el número de la pieza que vaya a ocuparla. Por ejemplo, los cubos rotulados con un 3, si fueran retirados intactos de los lugares que conceptualmente ocupan, producirían la

forma de la pieza número 3. No es difícil ver que, según lo más o menos excavada que esté, cada pieza ocupará en la matriz entre 14 y 24 cubos.

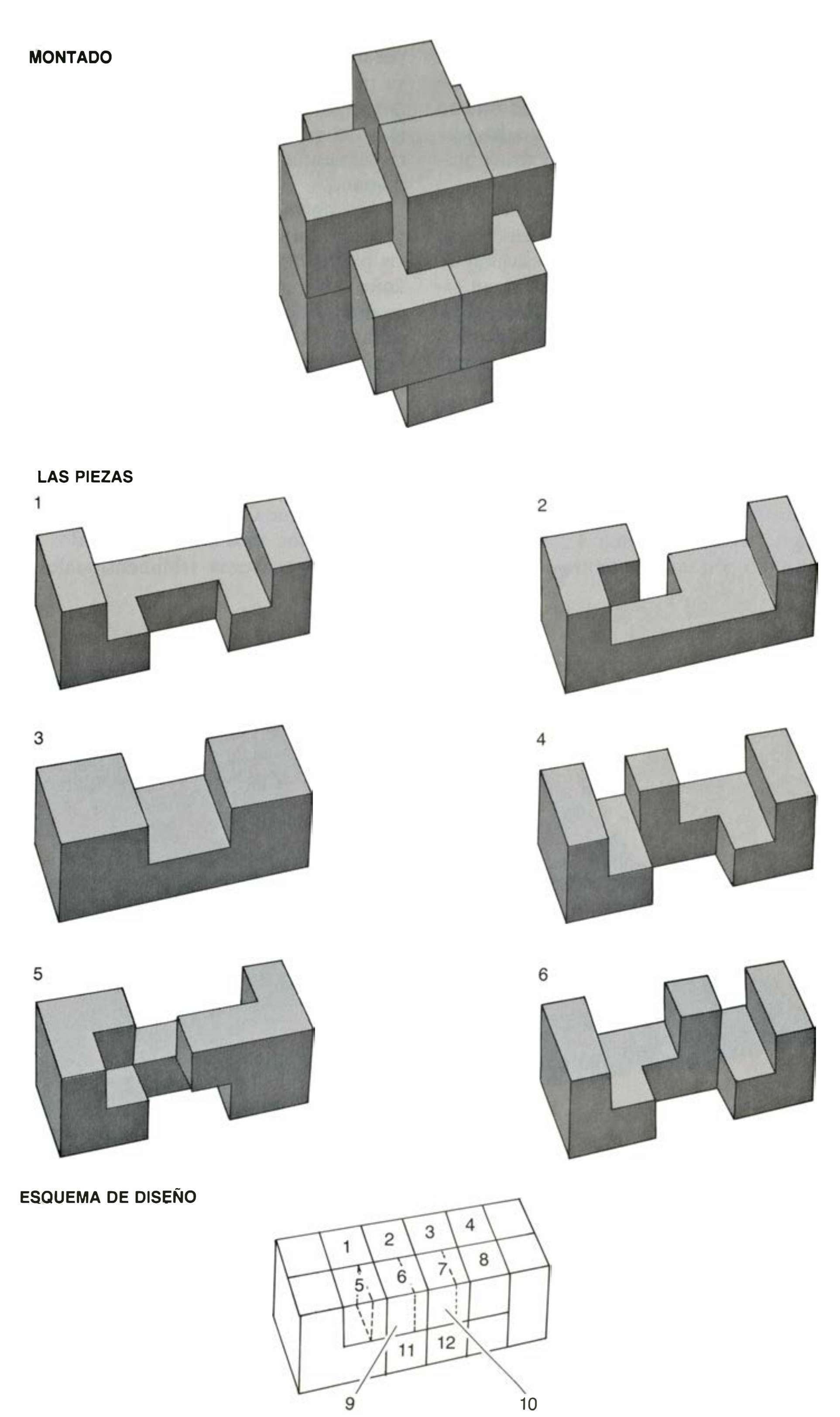
El programa de análisis de configuración revisa cada una de las seis listas que describen las piezas de acuerdo con las coordenadas de los cubos que las componen. Las coordenadas se someten después a una diversidad de manipulaciones, equivalentes a traslaciones, giros y simetrías de la pieza dentro de la matriz. Como es obvio, se trata de un procedimiento metódico que requiere la ejecución de muchos bucles.

La primera pieza (que tiene asignado el número 1) se sitúa en una posición canónica dentro la matriz tridimensional, para lo cual se rotulan con 1 un conjunto de los cubículos de ésta. Tales cubículos son reproducción exacta de la forma de la pieza. Seguidamente, el programa tantea con cada una de las piezas restantes, tratando de situarlas en posiciones que se acoplen con la pieza de partida. Se ensayan todas las posiciones posibles de la segunda pieza, tarea para la que hacen falta dos bucles. Dos bucles más permiten al programa tratar de acoplar una tercera pieza a la configuración definida por las dos primeras. Es preciso, de nuevo, ensayar todas las posiciones. Para mirar de acomodar las tres piezas restantes, el programa tiene seis bucles más. La mayoría de los programadores diría que eso es abusar de los bucles encajados. Cada vez que se ensaya una pieza nueva en una nueva posición y orientación, el programa revisa cada uno de los 512 cubículos de la matriz que describe el estado del rompecabezas, buscando si hay dos que estén doblemente numerados. Si los hay, la combinación tiene que desecharse, porque dos de las piezas están tratando de ocupar un mismo espacio: la configuración es ilícita (en el sentido matemático del término).

El conjunto de todas las posibles configuraciones de las seis piezas puede representarse en forma de árbol. La raíz del árbol es la pieza número 1, situada en forma canónica. Es ésta una configuración lícita. Al ir añadiendo piezas nuevas, en nuevas orientaciones, a cada una de las configuraciones lícitas descubiertas hasta el momento, se abre en el árbol de configuraciones una nueva rama, o un punto terminal.

En las puntas más alejadas de las ramas del árbol puede que el programa llegue a producir cierto número de configuraciones lícitas, compuestas por seis piezas perfectamente ajustadas y cerradas, que forman un "cardo". Algunas de estas configuraciones, sin embargo, están trabadas internamente sin remedio; no importa cómo se empuje, se tire o se trate de liberar las piezas: no se separarán (porque es imposible). Y es que, para empezar, tales piezas nunca hubieran podido fabricarse. Existen solamente en la imaginación del programa de configuraciones. ¿Cómo se las ingenia entonces Cutler para saber si una configuración lícita, con las seis piezas acopladas, puede desmontarse? Para ello recurre a un segundo programa, el de desarmado.

El programa de desarmado analiza la misma tabla de $8 \times 8 \times 8$ que se utilizó para descubrir las configuraciones lícitas. Pero lo que se propone es tratar de mover cada una de las piezas una o va-



1. El desconcertante cardo de Bill

rias unidades a lo largo de alguna de las tres direcciones perpendiculares. Es decir, tratará de sacar cada una de las piezas encajadas en el rompecabezas, intentando extraerla, o desplazarla hacia arriba o hacia los lados. Lo mismo que antes, se utiliza un grafo arbóreo para representar todas las posibilidades. La raíz del árbol es el rompecabezas intacto. En cada uno de los estadios de desarmado a que el programa va llegando, la rutina busca sistemáticamente, y descubre los posibles desplazamientos de cada pieza. Lo mismo que las personas sabían desde mucho antes, una vez separadas una o dos piezas, las restantes se pueden extraer bastante pronto.

Así pues, en lo que a Cutler concierne, para que un cardo de seis piezas tenga un buen diseño, la extracción de una primera pieza tiene que ser superlativamente difícil. En el desconcertante cardo de Bill, hacen falta no menos de cinco movimientos distintos para extraer la primera pieza.

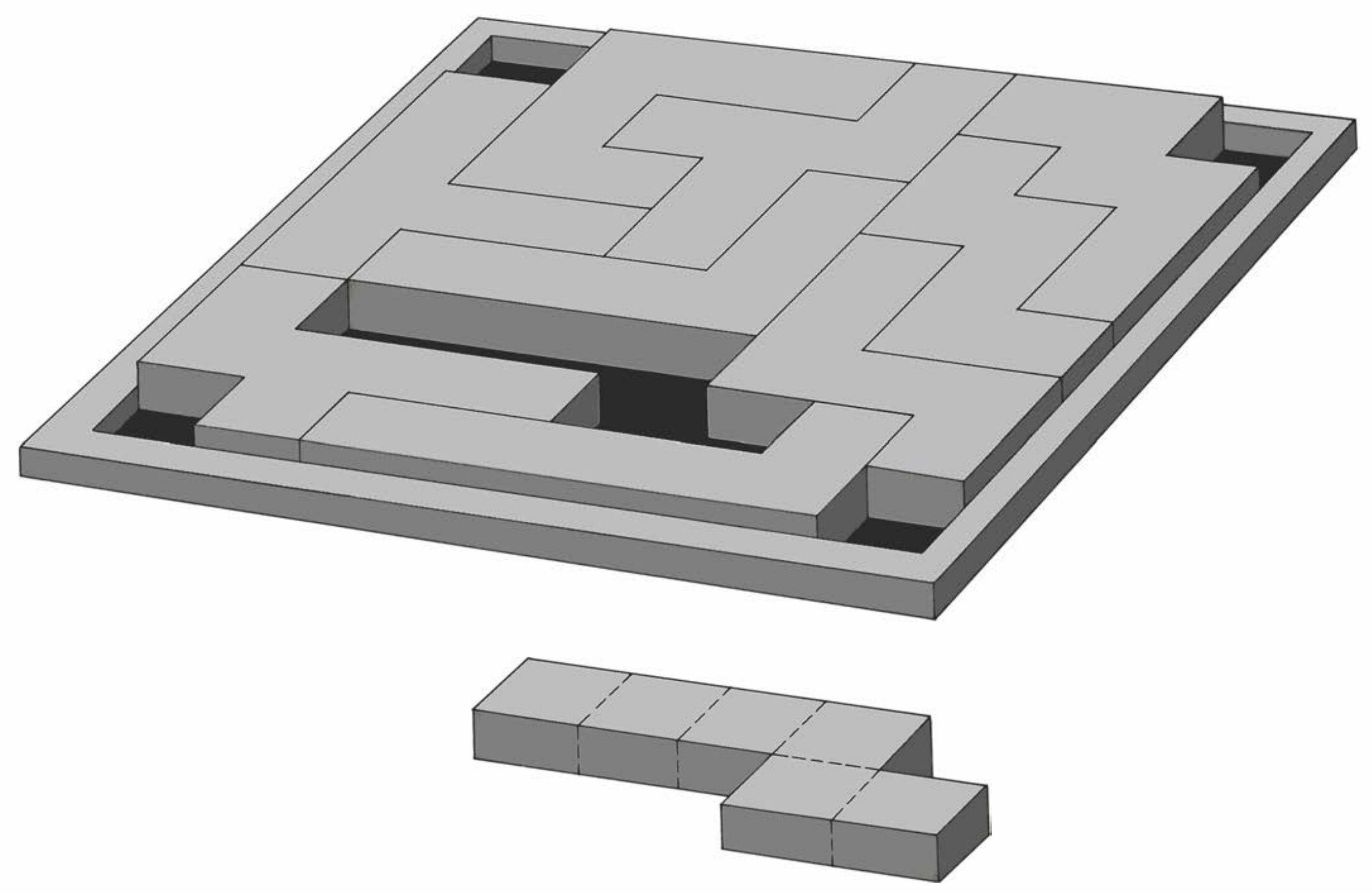
Al diseñar el desconcertante cardo de Bill, obra maestra de Cutler, éste ensayó y desechó nueve conjuntos de piezas. El décimo se eligió con intuición particularmente maligna [*véase la figura 1*]. El programa de configuraciones dio con una configuración lícita de estas piezas, y solamente con una; y el programa de desmontaje descubrió que había exactamente una forma de desarmar el rompecabezas. Tan sólo podía extraerse una de las seis piezas, y ello después de cuatro movimientos aparentemente estériles.

El programa de desarmado de cardos constituye, a la vez, un programa para resolverlo. Como es obvio, es preciso ante todo darle una descripción exacta de las piezas que componen un rompecabezas cardo, que tienen que estar ya incrustadas en la tabla tridimensional de 8 × 8 × 8 del programa. La salida del programa es una sucesión de movimientos que podría reproducir un humano.

Supongamos, sin embargo, que al programa nada se le dijera acerca de las piezas que componen el cardo. Su única alternativa sería manipular un modelo físico del rompecabezas. Resulta divertido imaginar al programa adaptado para hacer funcionar los dos brazos de un robot manipulador. Quedarían a la vista sus maquinaciones conforme, a lo largo de muchos días, fuese explorando el inmenso árbol de posibles jugadas.

Al igual que Cutler, Coffin se ha dedicado varios años a inventar cardos y otros rompecabezas tridimensionales. Uno de sus éxitos más recientes es bidimensional: se le solicita al lector que encaje 10 piezas hexominós en una bandeja plana y cuadrada, sin que se superponga ni traslape ningún par de ellas [*véase la figura 2*]. Cada hexominó consta de seis cuadrados iguales de madera, pegados unos a otros por uno o más lados. Ya resulta notable dar con un rompecabezas de hexominós cuyo montaje sea complicado; pues Coffin tiene la llave computarizada que abre las puertas de un auténtico almacén de tales rompecabezas. Cada uno difiere de los demás, y su dificultad es de grado conocido. Deje los rompecabezas por azar sobre una mesita de café en una fiesta o reunión. Tendrá la seguridad de que ninguno de sus invitados lo resolverá rápidamente, y argumentarán luego no haberlo visto nunca, pues el rompecabezas será verdaderamente nuevo para todos.

Los criterios de que se vale Coffin para calibrar la dificultad de tales rompecabezas tienen en cuenta tanto las formas de las piezas propiamente dichas como el número de posibles soluciones. En el "proyecto Cornucopia", Coffin solamente utiliza piezas de tipo hexominó. Para aumentar su dificultad, se vale únicamente de hexominós que sean asimétricos y que no con-



2. Uno de los rompecabezas con hexominós de la cornucopia de Stewart T. Coffin

tengan cuadrados de 2 × 2. El total definitivo de hexominós utilizables asciende tan sólo a 17. Al colocar correctamente 10 de tales piezas en una bandeja de 8 × 8 quedarán descubiertos cuatro espacios. Unicamente se considerarán aceptables las soluciones en las que los cuatro huecos queden simétricamente distribuidos. En el modelo que Coffin me envió hay al menos dos soluciones: una en la cual los cuatro cuadrados ocupan el centro de la bandeja y, otra, en la que ocupan los vértices.

Existen 19.448 modos de seleccionar subconjuntos de 10 hexominós de entre los 17. No todos esos subconjuntos originan rompecabezas interesantes. En realidad, muchos ni siquiera pueden alojarse en la bandeja de 8 × 8. ¿Cómo reconocer, entre todas esas posibilidades, los mejores rompecabezas?

Recientemente, Coffin recabó la ayuda de Michael D. Beeler, infatigable programador, cuya última mención en esta sección se debió a ser uno de los primeros en explorar el juego llamado Vida [véase "Juegos de ordenador", junio de 1985]. Beeler escribió un programa que trata, por las bravas, de acoplar la totalidad de las 10 piezas del subconjunto en una bandeja. El programa genera automáticamente todas las soluciones. Si no son demasiadas, las presenta, juntamente con el juego de los 10 hexominós utilizados.

Lo mismo que los programas de Cutler para el diseño de cardos, el programa de Coffin se funda en la exploración de un árbol. El programa comienza examinando un subconjunto específico de hexominós generados por su bucle principal. En esencia, el programa va inspeccionando la bandeja del rompecabezas, rastreándola línea por línea. Para ello es necesario un segundo bucle residente en el seno del bucle principal. Cada vez que se encuentra con un cuadrado vacante, el programa selecciona otro hexominó no utilizado todavía (otro bucle), y trata de acoplarlo en el tablero en todas las posiciones posibles (un cuarto bucle). Siempre que encuentra un lugar donde encaja una pieza se genera una nueva rama del árbol de potenciales soluciones; el programa avanza entonces hasta el próximo cuadrado vacante y ensaya la pieza siguiente.

De no ser por ciertos admirables atajos algorítmicos, el programa generador de soluciones no sería capaz de hallar todas las soluciones posibles en un tiempo razonable. Una de tales estratagemas consiste en someter cada conjunto a una especie de verificación de paridad, antes incluso de que el programa inicie la ejecución del segundo bucle. Un día, examinando los 17 hexominós, Beeler advirtió que si se consideraran recortes extraídos de un tablero escaqueado, 11 hexominós tendrían tres cuadrados blancos y otros tres negros. Los seis hexominós restantes tendrían cuatro cuadros de un color y dos del otro. Por otra parte, una solución que haga intervenir a un conjunto de cualesquiera 10 hexominós habrá de tener el mismo número de cuadros blancos y de cuadro negros, a saber, 30. Beeler concluyó que solamente podría hallarse una solución cuando el número de hexominós "descompensados" fuese par. Todo subconjunto que no obedeciese a esta sencilla regla podría rechazarse por insoluble. De este modo, el número de potenciales iteraciones del programa se rebajó de 19.448 a 9746.

El número de soluciones que el programa de Beeler encuentre para una subconjunto de hexominós dado determina el nivel de dificultad. Los niveles que Coffin especifica van desde "difícil" (varias soluciones) hasta "muy difícil" (tan sólo una solución). El programa de Beller va produciendo profusa y regularmente nuevas soluciones. Coffin ha dotado a su taller de nuevas herramientas; además, ha descrito sus esfuerzos en la creación de rompecabezas en su obra *Puzzle Craft*.

Destaquemos una notable diferencia entre los rompecabezas de Cutler y de Coffin: resulta difícil desarmar un cardo de seis piezas; en cambio, no hay ninguna dificultad en desmontar uno de los rompecabezas de la Cornucopia de Coffin: basta retirar las piezas de la bandeja. El carácter tridimensional del rompecabezas cardo impide, en parte, tan sencilla solución. Una criatura tetradimensional no encontraría la menor dificultad al habérselas con uno de los rompecabezas de Cutler. Tal criatura podría sacar partido de una nueva y diferente dirección "hacia arriba". Por otra parte, incluso un ser tetradimensional tropezaría con dificultades para montar nuevamente un cardo, lo mismo que las tenemos nosotros para recomponer un rombecabezas bidimensional. Este experimento mental sugiere la idea de un cardo bidimensional que pudiera desmontarse deslizando las piezas hacia el exterior, por los costados de una bandeja cubierta. ¿Resulta ello posible? Imaginemos que nuestro cardo bidimensional constara de ocho piezas. Por cada costado de la bandeja sobresalen dos piezas. Las piezas internas pueden tener cualesquiera formas rectilíneas. Se invita a los lectores a presentar diseños.

El rompecabezas-enigma de Engel me ha proporcionado algunas horas de entretenimiento y frustración. Todavía no he dado con una solución general, pero Douglas R. Hofstadter (cuya sección "Temas metamágicos" apareció en esta revista hace pocos años) ha preparado un programa para manipular los círculos. Engel añade que varias personas, duchas con el cubo de Rubik, no han logrado resolver el suyo.

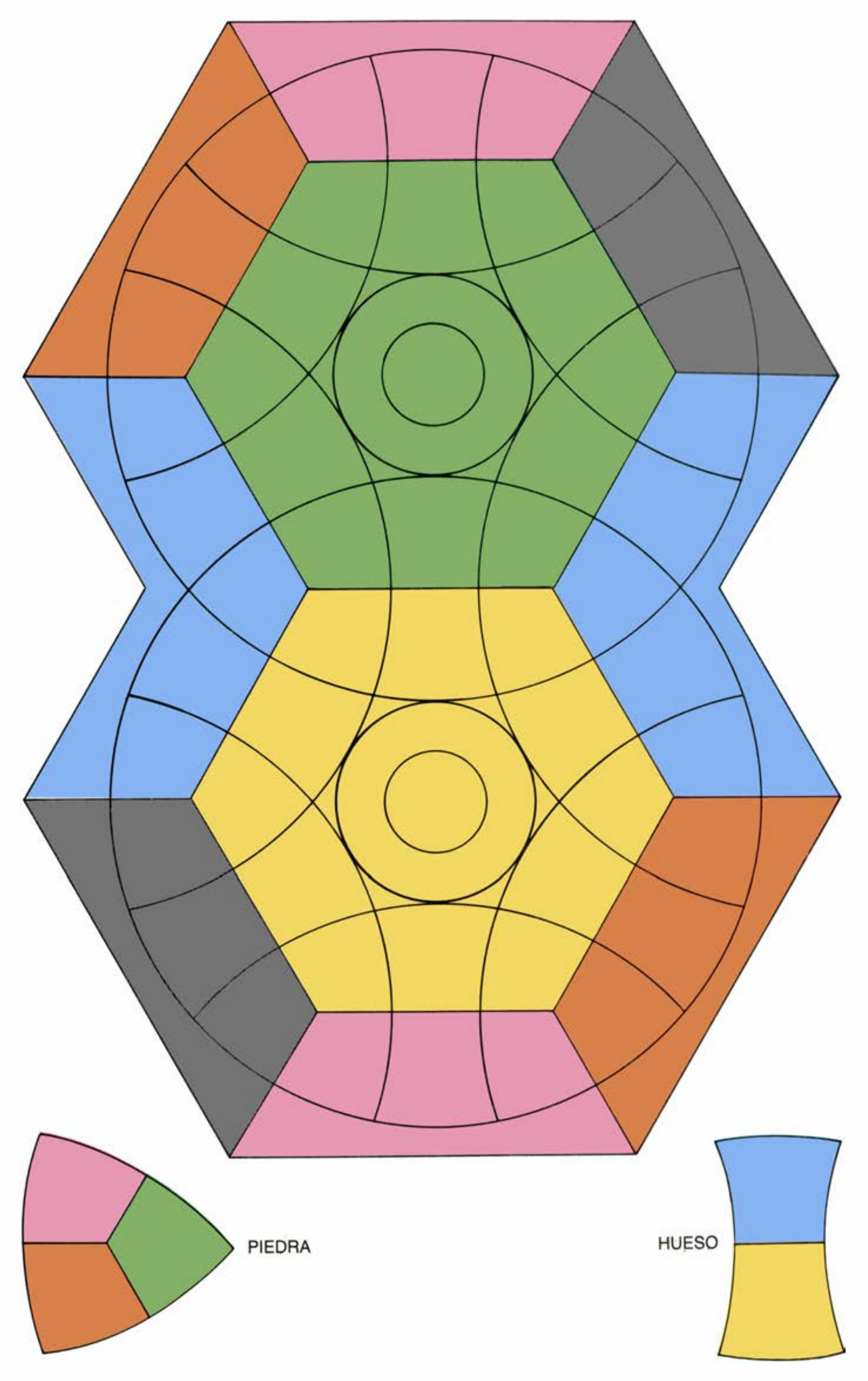
El enigma consiste en dos círculos que se intersecan, incrustados en un soporte de plástico. En torno a cada círculo hay seis piedras intercaladas con seis huesos. Las piedras se asemejan a triángulos gordinflones, mientras que los huesos hacen pensar en rectángulos desnutridos. Dado que los círculos se interceptan, comparten dos piedras y un hueso [*véase la figura 3*]. Los círculos de piedras y huesos pueden girar. Si se gira 60 grados uno de los círculos, el de arriba, pongamos por caso, una de las piedras y uno de los huesos antes compartidos con el círculo inferior le son arrebatados, y se remplazan por un nuevo hueso y una nueva piedra. El giro alternativo de los dos círculos según cualquier múltiplo de 60 grados, en dirección aleatoria, tiene por efecto el que los huesos y las piedras queden concienzudamente revueltos.

En su configuración inicial, el rompecabezas está dividido en 10 zonas dispuestas hexagonalmente. Ocho zonas exteriores reciben cuatro colores: rojo, naranja, azul y negro. Las zonas simétricas opuestas son del mismo color. En cada círculo quedan dos zonas interiores, coloreadas de amarillo y verde. Cada piedra reside en tres zonas, y tiene, por consiguiente, tres colores. Cada hueso toca solamente en dos, y por consiguiente tiene dos colores nada más.

Cuando se desordenan los círculos de Engel como se ha descrito, queda a la vista un mosaico de confuso colorido; lo que fuera grata ordenación es ahora caos cromático. ¿Cómo puede un rompecabezas cuyo total de movimientos es sólo una fracción de los posibles en el cubo de Rubik resultar igual de difícil?

Engel me ha mostrado un conjunto completo de instrucciones para resolver el enigma, pero lo guardaremos en reserva durante algunos meses, para dar tiempo a que todos los lectores interesados ensayen su mano en la resolución del rompecabezas. De los computólogos se espera que ofrezcan, además, algoritmos de espectacular eficiencia.

Aunque no he escrito tal programa, el siguiente análisis pudiera resultar



3. El enigma de Engel (sin desordenar)

útil. Estando el enigma debidamente ordenado, se numeran las piedras en el sentido de las agujas del reloj, de 0 a 9, comenzando a partir del hueso residente en ambos círculos. La configuración se escribe entonces

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 .

Supongamos que se rota el círculo superior 60 grados en el sentido de las agujas del reloj. Si consideramos que las 10 posiciones de la serie anterior representan las correspondientes ubicaciones en el rompecabezas, el efecto del giro es la permutación

5 0 1 2 3 4 6 7 8 9 .

Fijémonos en que, en efecto, el 5 se ha extraído de su posición inicial, la sexta, y colocado en la primera. Los lectores pueden generar fácilmente las otras tres permutaciones. Las cuatro pueden incluirse en un programa que funcione sobre una tabla de tamaño 10. Invocando las permutaciones en orden aleatorio, el rompecabezas quedará desordenado. El mismo esquema de representación puede hacer que las tentativas por lograr una solución mediante ordenador vayan más rápidas.

Ahora, finalmente, podrán los lectores comprender por qué considero yo que el rompecabezas de Engel es unidimensional.

En el artículo de septiembre, al presentar el juego de la Odisea Robótica, sugería yo que los lectores diseñasen un microcircuito "a la medida" para el robot Correparedes. La tarea es bastante más compleja de lo que parece. La dificultad principal consiste en resolver las esquinas convexas. A menos que el cohete impulsor causante del movimiento se apague al llegar a la esquina, el robot irá lentamente deslizándose hacia el interior de una sala.

De las soluciones que he recibido hasta ahora, solamente dos parece que pueden funcionar. J. P. Schwab y Joseph A. Gregor diseñaron microcircuitos que contienen cuatro básculas biestables. Quizá no sea suficiente una solución con sólo dos básculas.

En los últimos meses han llegado a la mesa de mi despacho dos docenas de reglas mnemotécnicas para recordar las cifras de π. Inútil decir que la mayoría de ellas las ha sugerido más de un lector. Entre mis favoritas se cuentan algunas muy antiguas que, debidamente desempolvadas, pueden ser del interés de nuevos lectores.

La idea esencial de estas reglas mnemotécnicas consiste en formar una frase significativa, y si es posible, alusiva a π, en la que el número de letras de cada palabra sea la cifra decimal de la misma posición.

Por ejemplo, para recordar que $\pi =$ $= 3{,}14159265358979323846264338\ldots$, podríamos valernos de la siguiente frase: "¿Qué...? ¿Y cómo π reúne infinidad de cifras? ¡Tiene que haber períodos repetidos! Tampoco comprendo que de una cantidad poco sabida se afirme algo así, tan atrevido". (Los signos diacríticos no se cuentan.) Veamos ahora algunas frases en inglés y en otros idiomas, construidas sobre el mismo esquema.

Peter M. Brigham, de Brighton, Massachusetts, envió la siguiente: "How I wish I could enumerate pi easily, since all these (censored) mnemonics prevent recalling any of pi's sequence more simply." [La traducción, que no sirve como recordatorio de pi, sería: "¡Cuánto me gustaría poder enumerar pi fácilmente!, puesto que todos estos (censurado) recordatorios impi-

den recordar más fácilmente la serie de cifras de pi."]

El campeón, en lo tocante a longitud, es Jay L. Jung, de Tempe, Arizona. El recordatorio de Jung prosigue hasta 110 cifras decimales. Mencionaré las catorce primeras: "How I wish I could enumerate pi easily which men known skillful calculate forever..." ["Cuánto me gustaría poder enumerar pi fácilmente, que hombres de conocida habilidad calculan eternamente..."

Multitud de personas (entre ellas, el Premio Nobel Linus Pauling) enviaron una o varias muy conocidas, como la siguiente:

"How I want a drink, alcoholic of course, after the heavy chapters involving quantum mechanics." [¡Cuánto me apatece un trago, alcohólico desde luego, después de esos pesadísimos capítulos sobre mecánica cuántica!]

En esta diminuta recopilación valdrá la pena incluir unos cuantos mnemónicos más o menos divertidos. Michael Stueben, de Annandale, Virginia, envió un poema arquimediano un tanto demencial:

How I wish I could recollect pi.
Eureka! cried the great inventor.
Christmas pudding, Christmas pie
is the problem's very center.

[¡Cuánto deseo ser capaz de recordar pi.
¡Eureka!, gritó el gran inventor.
Budín de Navidad, tarta de Navidad.
Ese es el mismísimo centro del problema.]

Clive J. Grimstone, de Londres, tiene un recordatorio que llega a las cien cifras decimales, aunque no incluye el 3 inicial. He aquí los versos:

I know a maths professor.
He always weeps and sighs
whenever polyhedra
capsize...

[Conozco un profesor de matemáticas
que siempre llora y gime
cuando caen los poliedros...

Los lectores que tengan buen oído musical pueden acordarse de pi silbando o tarareando una tonada que presentó Rodney A. Brooks, de Bethesda, Maryland. Para evitar las dificultades de la notación musical, me limitaré a mencionar que Brooks le asignaba a cada cifra de pi una nota de la escala diatónica. En clave de Do, por ejemplo, Do = 1, Re = 2, y así sucesivamente. A la derecha de cada nota figura, entre paréntesis, su duración. El valor es múltiplo de un dieciseisavo de duración de la nota. Por consiguiente, la notación es

3(1)1(1)4(1)1(1)5(5)9(1)2(1)6(1)5(6)
3(1)5(1)8(5)9(1)7(1)9(1)3(6)2(1)3(1)
8(1)4(1)6(4)2(2)6(6)4(2)3(12).

El ritmo es de 4/4; el primer compás acaba entre la cuarta y la quinta nota.

Tres lectores, entre ellos John Henrick, de Seattle, Washington, enviaron este poemita:

Que j'aime à faire apprendre un nombre utile aux sages!
Immortel Archimède artiste ingénieur
Qui de ton jugement peut priser la valeur!
Pour moi ton problème eut de pareils avantages.

[¡Cuánto me gusta enseñar un número útil a los instruidos!
Arquímedes inmortal, ingeniero artista.
Quién pudiera estimar el valor de tu juicio!
Para mí, tu problema tuvo parecidas ventajas.]

He aquí la frase que Henrick presentó en alemán:

Wie? O! Dies π
Macht ernstlich so vielen viele Müh!
Lernt immerhin. Jünglinge, leichte Verselein,
Wie so zum Beispiel dies dürfte zu merken sein!

[¿Cómo? ¡Oh!
¡Cuantísimas molestias causa en verdad a tantos este π!
¡Aprendedlo, de todos modos, en versitos festivos y juveniles,
Como, por ejemplo, estos que podeis observar!

Fueron los griegos, en la persona de Arquímedes, quienes dijeron acerca de π la primera palabra. Linos J. Jacovides, de Birmingham, Michigan, está decidido a que sean ellos también quienes digan la última:

ἀεὶ ὁ θεὸς ὁ μέγας γεωμετρεῖ τὸ κύκλου μῆκος ἵνα ὁρίσῃ διαμέτρῳ.

["Dios todopoderoso juega con la geometría a fin de definir la circunferencia del círculo por medio de su diámetro."]

Taller y laboratorio

Según se conecten, dos péndulos interactuarán imprevisiblemente

Jearl Walker

Supóngase que conectamos dos péndulos iguales por medio de un muelle y que, mientras sujetamos uno, tiramos del otro lateralmente de modo que el muelle se estire. Soltemos luego los dos. ¿Cómo se comportará el sistema?

Nos insinúa la intuición que el muelle de enlace obligará al péndulo inicialmente inmóvil a ponerse en movimiento hasta que los dos péndulos se balanceen caóticamente, de modo que ambos posean aproximadamente la misma energía. Pero, sorpresa, no es ése el estado final de los péndulos. Por el contrario, se intercambian periódicamente la energía; y así, unas veces se para uno de ellos y otras, su par. ¿Cómo explicar estos fenómenos?

Hay un ejemplo clásico de sistema oscilante con transferencia periódica de energía, que consiste en dos péndulos iguales suspendidos de una varilla horizontal que cuelga de un soporte rígido mediante dos trozos de cuerda. Cuando se hace que uno de ellos oscile en un plano paralelo al de la varilla, comienza a ceder su energía al otro. Finalizada esa transferencia, la energía se transmite en sentido contrario y, así, unas veces estará inmóvil uno de los péndulos, y otras veces lo estará el otro.

En otro ejemplo los péndulos cuelgan cada uno de una cuerda y se balancean perpendicularmente a un trozo de cuerda que une las anteriores. En un caso semejante los péndulos están suspendidos de un tubo de pequeño diámetro, sujeto a una cuerda que atraviesa su interior. Aquí, los péndulos oscilan perpendicularmente al plano del tubo. En ambas versiones los péndulos intercambian periódicamente sus energías, al tiempo que sus balanceos crecen y decrecen.

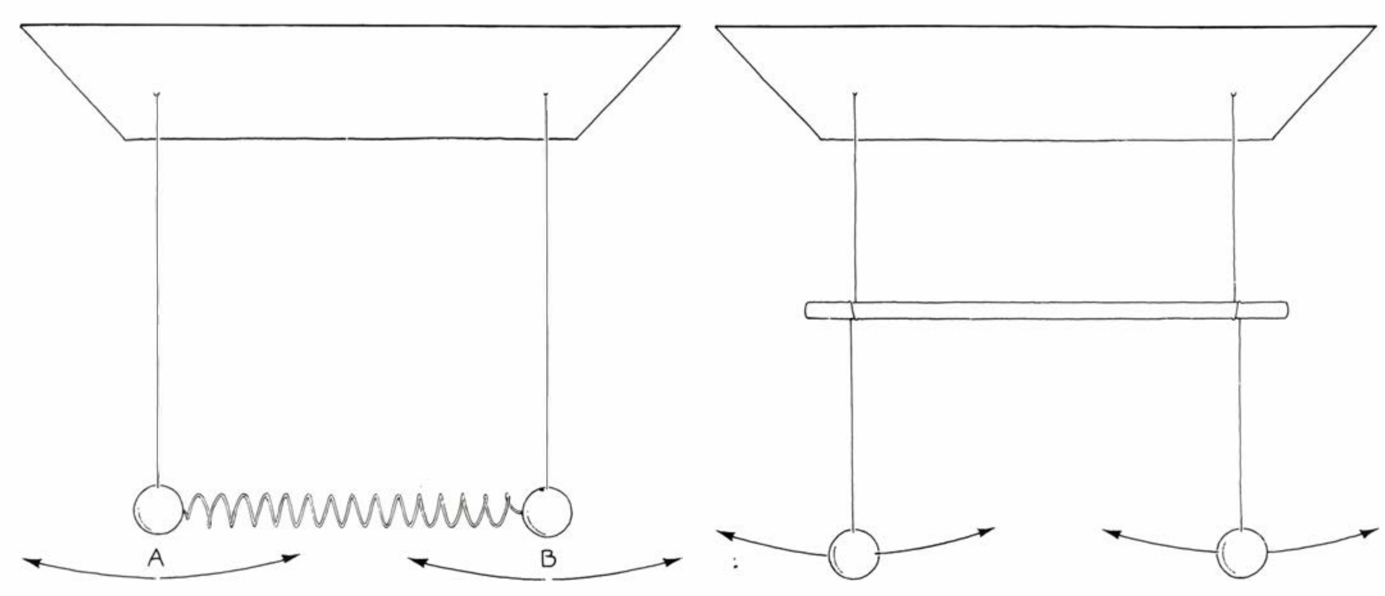
En otro sistema distinto, llamado péndulo de muelle resonante, se sujeta un objeto al extremo inferior de un muelle vertical, cuya punta superior se fija a un soporte rígido. Si tiramos hacia abajo del objeto y luego lo soltamos, el muelle oscilará verticalmente durante un rato, para ponerse a oscilar después como un péndulo. Esta oscilación no tarda en disminuir y reaparece la oscilación vertical. El sistema se comporta igual si se pone en movimiento con la oscilación pendular.

Vayamos con el cuarto ejemplo: el péndulo de Wilberforce, llamado así en honor de L. R. Wilberforce, físico inglés que lo estudió en 1894. Consta de un pequeño objeto, con dos apéndices horizontales, sujeto a un muelle vertical por el extremo de éste. Se tira hacia abajo del objeto y se suelta, con lo que el muelle oscila verticalmente. Pero esta oscilación desaparece enseguida a la vez que el objeto comienza a mecerse, girar en un sentido y otro en torno a un eje vertical que pasa por su centro. Cuando cesan las oscilaciones del muelle, toda la energía del sistema la posee la rotación. Seguidamente, la energía retorna a las oscilaciones del muelle y, conforme aumentan éstas, va desapareciendo la rotación. Con ello se reanuda el ciclo.

Para explicar el comportamiento de estos sistemas empezaremos por los dos péndulos unidos a través de un muelle. Se trata del sistema más costoso a la hora de ponerlo en marcha; pero también es aquel en que la transferencia de energía resulta más fácil de imaginar. Despreciaremos cosas tales como el rozamiento y la resistencia del aire.

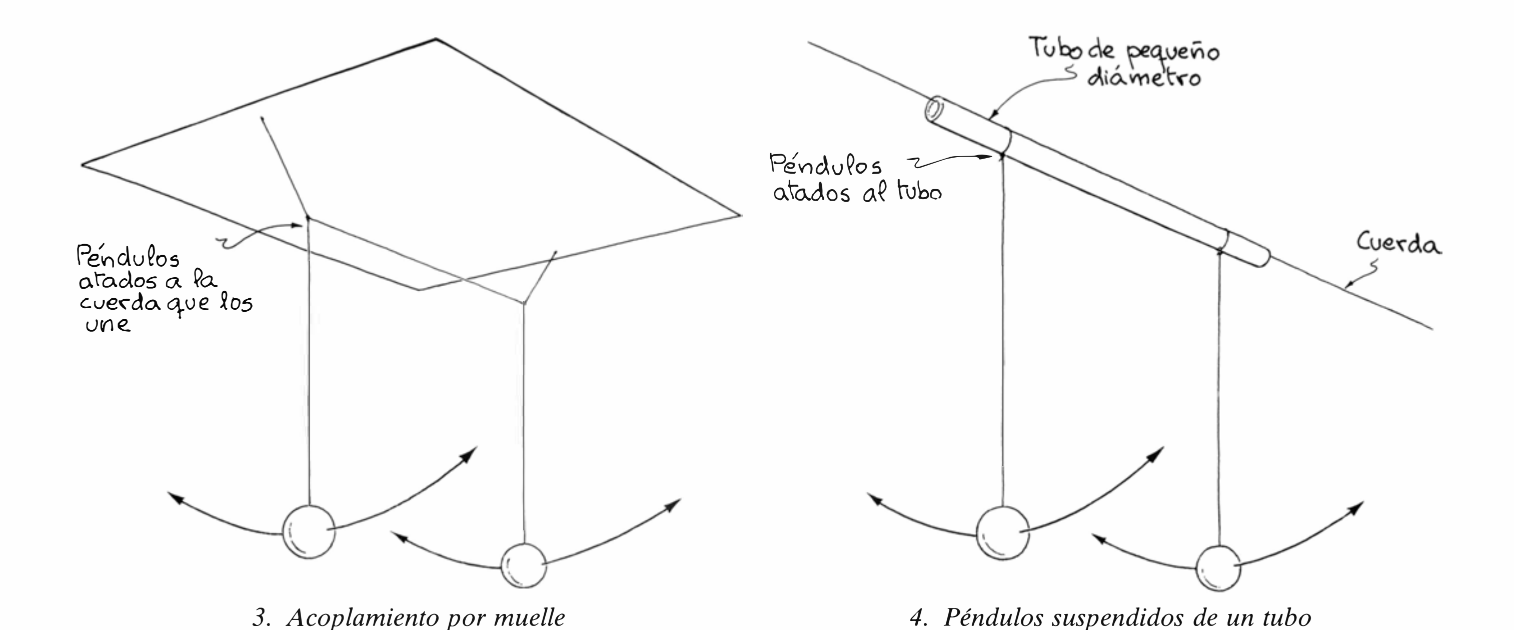
Supongamos que sujetamos el péndulo *A* mientras tiramos del péndulo *B* hacia la derecha, para luego soltar los dos. Cuando *B* comienza a balancearse, a derecha e izquierda, empuja y tira del muelle, y éste, a su vez, empuja y tira de *A*. Cuando *A* inicia su oscilación, en general el muelle se opone al movimiento de *B* y favorece el de *A*. Así, pues, el muelle es responsable de la transferencia de energía de *B* a *A*. Cuando *B* se ha quedado sin energía, la situación se invierte.

El movimiento de los péndulos po-



1. Péndulos acoplados por medio de un muelle

2. Acoplamiento por varilla



3. Acoplamiento por muelle

4. Péndulos suspendidos de un tubo

demos examinarlo en función de sus modos normales, que son dos maneras en las que pueden oscilar sin que intercambien energía y la amplitud de cada uno permanece constante. (La separación entre la posición ocupada en cada instante y la posición en reposo se llama elongación; la elongación máxima recibe el nombre de amplitud.)

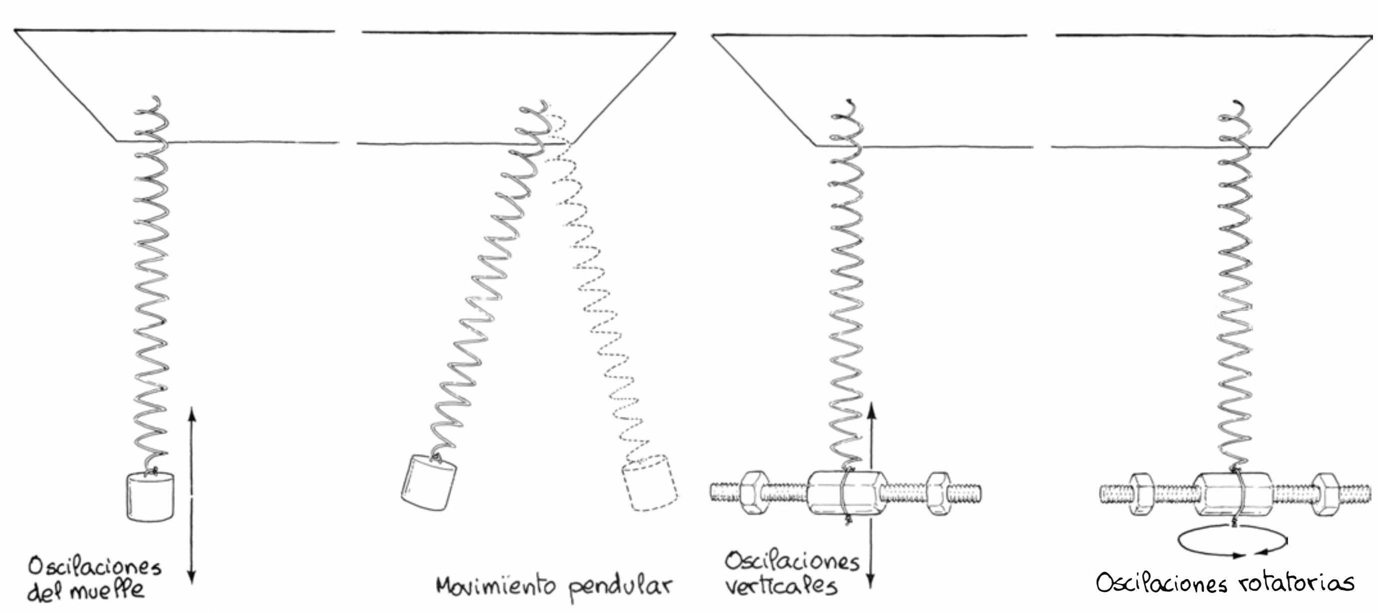
La existencia de los modos normales tiene su origen en la simetría. Suponiendo que los péndulos *A* y *B* los desplacemos la misma distancia a la derecha y luego los soltemos, se pondrán a oscilar sin variar la longitud del muelle. De hecho, oscilarán tal como lo harían sin el muelle. Como éste no transmite energía, el balanceo síncrono es un modo normal.

El otro modo normal puede crearse tirando por igual de ambos péndulos hacia lados opuestos. Si se sueltan simultáneamente, sus movimientos serán imágenes especulares. En este modo normal los péndulos estiran y comprimen el muelle; por tanto, aquí sí influye en el movimiento de éstos. Pero la fuerza que ejerce el muelle sobre *A* es simétrica con la que ejerce sobre *B*; por ejemplo, cuando empuja a *A* hacia la izquierda, a *B* lo empuja hacia la derecha con la misma intensidad. Dado que esta simetría en las fuerzas impide el intercambio de energía entre los péndulos, sus amplitudes permanecen constantes.

Cuando a un péndulo se le deja oscilar libremente, la frecuencia de su oscilación es proporcional a la raíz cuadrada del cociente de la aceleración de la gravedad entre la longitud del péndulo. En el primer modo normal cada péndulo oscila a esa frecuencia. En el segundo modo normal, la frecuencia de oscilación es mayor a causa de la fuerza impulsora del muelle.

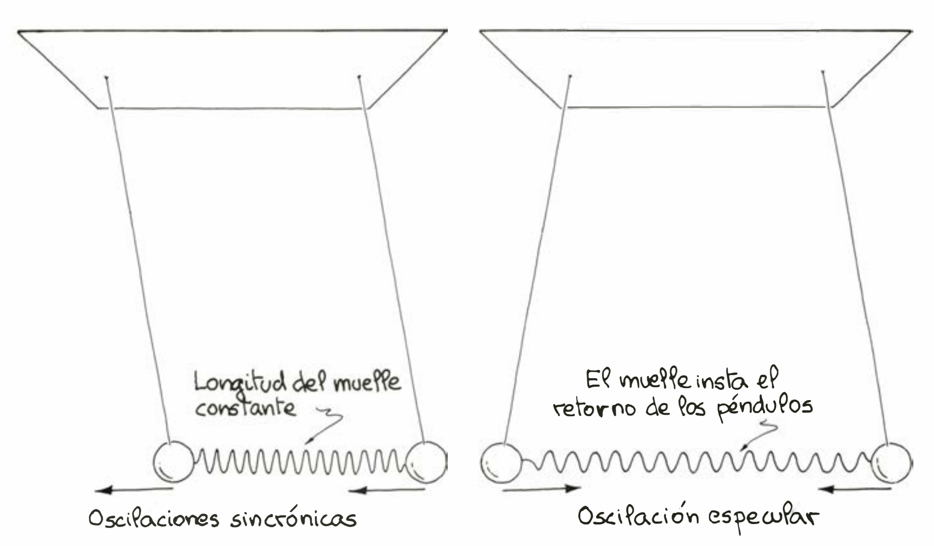
Por ejemplo, cuando los péndulos, tras un balanceo de uno hacia el otro, retornan a la vertical, lo hacen no sólo gracias a la gravedad, sino también merced al empuje del muelle. Cuando se balancean alejándose uno del otro, el muelle tira de ellos. Este proceso de empuje y tirón eleva la frecuencia.

La importancia de los modos normales radica en que todo movimiento del sistema puede expresarse como combinación de ellos. Supongamos que el sistema se activa desplazando y luego soltando sólo el péndulo *B*. A partir de



5. Péndulo de muelle resonante

6. Péndulo de Wilberforce



7. Modos normales de dos péndulos acoplados por un muelle

entonces, el movimiento de cada péndulo será expresable en forma de producto de dos variaciones senoidales. De éstas, una es rápida y su frecuencia es la media de las frecuencias de los modos normales. Siempre que uno de los péndulos esté en movimiento oscilará a esta frecuencia.

La otra variación sinusoidal modifica la amplitud de oscilación. La frecuencia de esta modificación es igual a la diferencia entre la frecuencia de los modos normales, por lo que resulta menor que la de oscilación de los péndulos. En virtud de ello se presenta una variación gradual en la amplitud de oscilación de cada péndulo. Cuando la amplitud de un péndulo llegue a un máximo, ese péndulo poseerá toda la energía del sistema; cuando su amplitud sea nula, estará en reposo. Como las variaciones de amplitud están exactamente en oposición de fase, un péndulo alcanza la amplitud máxima cuando el otro llega al reposo. Para otras maneras de activar el sistema, puede que los péndulos oscilen diferentemente, pero seguirán exhibiendo pulsaciones en las que varíen sus amplitudes.

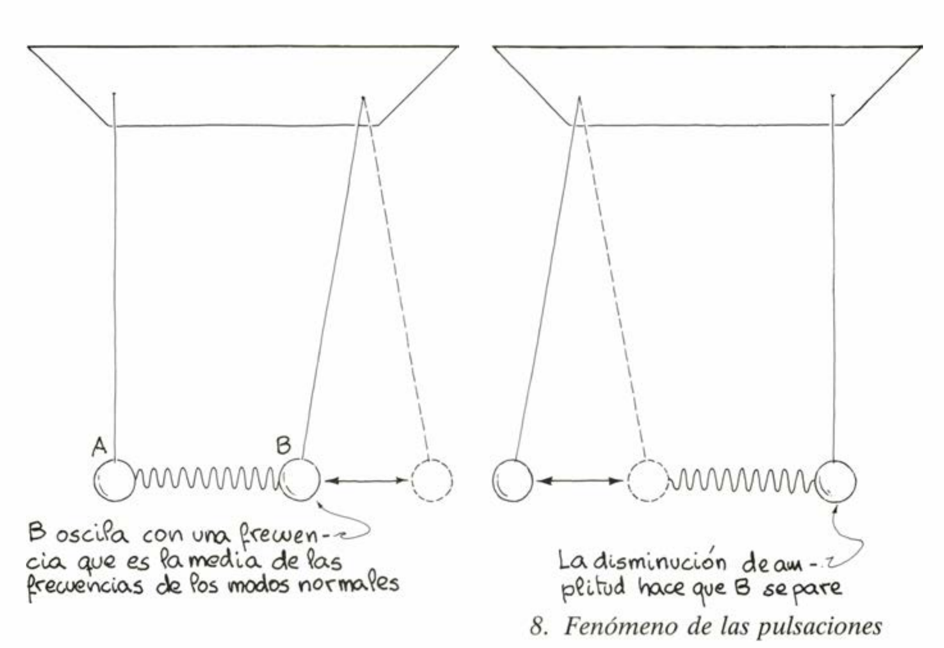
Acaso el lector haya percibido alguna vez pulsaciones audibles si escuchó dos tonos puros cuyas frecuencias difirieran ligeramente. En tal caso, el sonido que oyó no fue el de las dos ondas que en realidad llegaban a sus oídos, sino otro cuya frecuencia era la media de las frecuencias de ambas ondas. Su amplitud, relacionada con la intensidad con la que percibía el sonido, variaría con un ritmo igual a la diferencia entre las dos frecuencias. De aquí que percibiera un sonido que crecía y decrecía a la vez que las ondas se estrellaban una contra la otra.

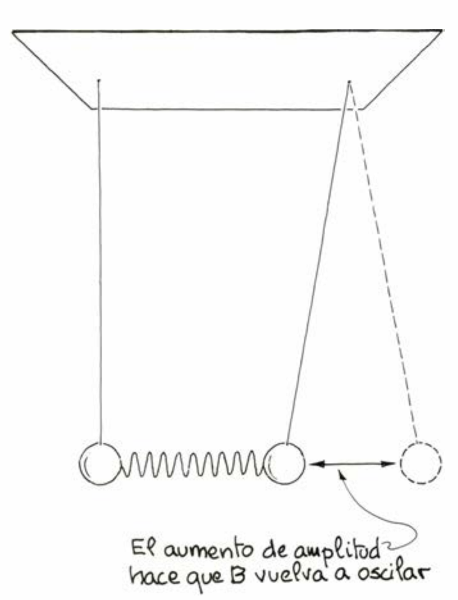
El sistema de dos péndulos acoplados a través de una varilla lo han estudiado Joseph Priest y James Poth, de la Universidad de Miami en Ohio. Este sistema les llamó la atención durante una representación de *My Fair Lady*, cuando un actor golpeó accidentalmente uno de los telones del decorado. Aquel telón colgaba de un extremo de una barra horizontal; del otro extremo de ésta colgaba otro telón, exactamente igual. La barra estaba suspendida de dos cables.

Cuando el primer telón comenzó a oscilar, paralelamente a la barra (o sea, en el plano vertical que contenía a la barra), su energía se transmitió gradualmente al otro telón. Luego, la energía pasaba periódicamente de un telón al otro, con lo que el público se distrajo no poco de la acción en escena. Priest y Poth estudiaron un sistema similar constituido por dos péndulos colgados de una varilla horizontal, en el que la cuerda de cada uno iba desde el soporte rígido del sistema hasta la varilla, rodeaba ésta una vez e iba a parar a la lenteja.

El movimiento de estos péndulos se acopla mediante la varilla. Cuando se hace que uno de ellos se balancee paralelamente a la varilla, la mueve, y ésta, a su vez, mueve el otro péndulo. Estos péndulos, al igual que los acoplados por muelle, poseen dos modos normales en los que no intercambian energía. Y todo movimiento del sistema que no sea un modo normal es expresable en función de los modos normales. En tales casos el sistema presenta pulsaciones.

Como antes, el origen de los modos normales está en la simetría. En el primer modo normal los péndulos oscilan exactamente en fase. Puesto que, en





8. Fenómeno de las pulsaciones

este modo, la varilla también se balancea, la longitud efectiva del péndulo debe medirse desde la lenteja hasta el soporte rígido del que está suspendida la varilla, ya que en la oscilación toma parte la longitud completa de la cuerda. La frecuencia asociada a este modo es baja porque la longitud efectiva de los péndulos es grande.

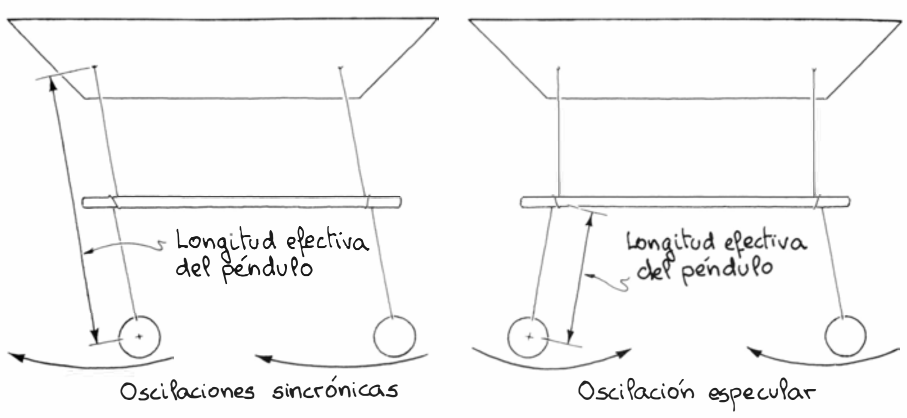
En el segundo modo normal, los péndulos se mueven en sentido contrario y la varilla permanece inmóvil. Ahora, la longitud efectiva del péndulo hay que medirla desde la lenteja hasta la varilla, ya que sólo ese tramo toma parte en la oscilación. Como los péndulos son cortos, la frecuencia de este modo normal será alta.

En el acoplamiento entre los péndulos interviene únicamente el movimiento paralelo a la varilla. En efecto, si un péndulo oscila perpendicularmente a ésta (o sea, perpendicularmente al plano vertical que la contiene), ese movimiento no prospera porque la cuerda se arrolla y desenrrolla en torno a ella sin moverla mucho. Así, si un péndulo oscila tanto paralela como perpendicularmente a la varilla, la oscilación perpendicular se mantendrá y la paralela generará pulsaciones.

Este movimiento lo evidenciaron Priest y Poth con modelos a pequeña escala y, asimismo, con un modelo a escala mayor. Tratábase de dos columpios de recreo colgados de una barra suspendida de un techo. En cada columpio se sentó un alumno. Tras impulsar a uno y comenzar a columpiarse, el sistema se movió igual que los péndulos de los modelos pequeños.

El sistema similar en el que los péndulos cuelgan de una cuerda y oscilan perpendicularmente a la longitud de ésta lo ha estudiado Michael J. Moloney, del Instituto de Tecnología Rose-Hulman en Terre Haute, Indiana. El movimiento de los péndulos se acopla porque cada uno tira de la cuerda de enlace, lo que, a su vez, influye en el movimiento del otro. Además, cada péndulo retuerce la cuerda, efecto que complica el estudio matemático, aunque Moloney reduce su importancia separando los péndulos 10 centímetros como mínimo.

En un modo normal, los péndulos oscilan en fase. La longitud efectiva consiste entonces en la distancia vertical desde la lenteja hasta el soporte rígido, porque en la oscilación participa toda la longitud. En el otro modo normal, los péndulos oscilan exactamente en oposición de fase, con lo que disminuye su longitud efectiva y resulta una frecuencia mayor. El sistema, cuando oscila siguiendo un patrón distinto de un modo normal, presenta pulsaciones.



9. Modos normales en péndulos acoplados por una barra

El péndulo de muelle resonante está emparentado con los sistemas que les he descrito hasta aquí, pero carece de modos normales y su análisis matemático se hace más difícil. Pese a ello, es un sistema fácil de montar y su comportamiento puede estudiarse en términos aproximados.

Si tiramos de la masa hacia abajo, alargando el muelle, y luego la soltamos, las oscilaciones verticales del muelle no tardan en ser reemplazadas por un movimiento pendular. Ahora bien, soltado el muelle, la energía del sistema permanece constante; por consiguiente, la energía del movimiento pendular debe proceder de la energía de las oscilaciones del muelle. Cuando finaliza la transferencia, el proceso se invierte, con lo que reaparecen las oscilaciones del muelle y desaparece el movimiento pendular.

Este intercambio de energía es óptimo cuando la masa unida al muelle lo alarga hasta unos 4/3 de su longitud inicial. Con el aumento de longitud se pretende disminuir la frecuencia del péndulo al objeto de establecer una relación entre las frecuencias asociadas a las oscilaciones del muelle puro y las asociadas al movimiento pendular puro. Las oscilaciones del muelle deben doblar en frecuencia al movimiento pendular. La inestabilidad que se genera entonces en el sistema es suficientemente alta para provocar en la masa un movimiento pendular.

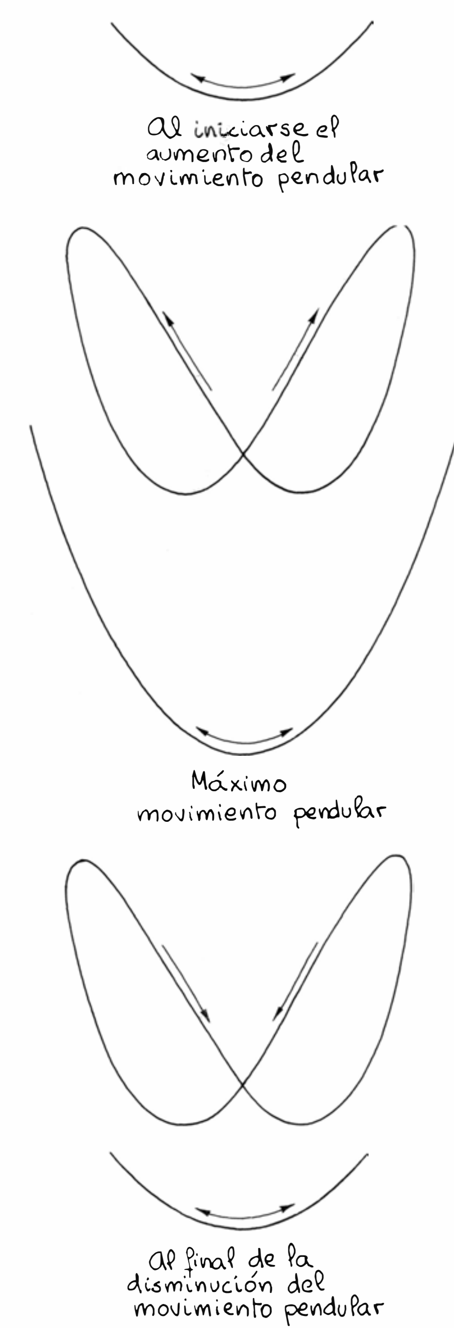
Martin G. Olsson, de la Universidad de Wisconsin en Madison, fue uno de los primeros en abordar el sistema muelle-péndulo. Para aumentar la longitud del muelle en una cantidad correcta, hay que ensayar colgándole diversos pesos. Pero no todos los muelles son aptos para el experimento. J. G. Lipham y V. L. Pollak, de la Universidad de Carolina del Norte en Charlotte, han señalado que, en la práctica, hay que considerar la masa propia del muelle además de la masa que se cuelgue.

Descubrieron que, para crear la relación de frecuencias adecuada, el muelle debe ser duro. Ellos mismos se construyeron un péndulo con un muelle: una pieza perteneciente a un "Aparato de Ley de Hooke". La masa del muelle es de 3,4 gramos y su longitud natural es de cinco centímetros. Una fuerza de unos 0,41 newton lo estira un centímetro.

Para hacerse con un peso para el muelle, Lipham y Pollak fundieron plomo en un vaso de laboratorio de pyrex de 50 mililitros; lo dejaron enfriar; después, lo extrajeron rompiendo el vidrio. Para unir el peso al muelle se sirvieron de un alfiler de costura o de un trozo de alambre que pasaban por un agujero que habían hecho en el plomo. Tras comprobar el peso en el muelle, lo repasaron y ajustaron hasta encontrar la masa óptima que resultó ser de 73 gramos. (Si se rebaja demasiado plomo, se añaden pequeñas pesas de una balanza de laboratorio común para "afinar" el aparato.)



10. Montaje de J. G. Lipham y V. L. Pollak



11. Curvas de Lissajous en un péndulo

Lipham y Pollak idearon además un procedimiento para emplear muelles blandos en el ensayo. (La cuestión es disminuir la frecuencia del movimiento pendular sin alterar la de las oscilaciones del muelle.) Para ello alargaron el péndulo añadiendo una cuerda entre el muelle y el soporte del que colgaba.

Si el muelle pudiera soltarse sin desplazamento horizontal alguno, oscilaría sólo verticalmente; el movimiento pendular no se generaría. En la práctica, empero, al soltarlo se produce siempre cierto desplazamiento horizontal de la masa suspendida del muelle. Y la consiguiente inestabilidad en las oscilaciones crea el movimiento pendular.

Cuando predominan las oscilaciones del muelle, como ocurre inicialmente, la excitación del movimiento pendular se dice que es un ejemplo de resonancia paramétrica. Con esta expresión quiere indicarse que el movimiento pendular depende de una cantidad (la longitud del péndulo) que está oscilando también. El resultado es una transferencia de energía al movimiento pendular. (La resonancia paramétrica da cuenta, asimismo, de nuestra capacidad de modificar la amplitud del balanceo cuando nos mecemos en un columpio. La elevación periódica de nuestras piernas y torso altera la longitud efectiva del péndulo, en este caso el columpio, con lo que suministramos energía al movimiento pendular.)

Cuando predomina el movimiento pendular, se devuelve energía a las oscilaciones del muelle en virtud de una resonancia más sencilla: el muelle se ve periódicamente estirado a una frecuencia igual a la de su oscilación. O sea, cada vez que la masa se balancea hasta su elongación máxima, durante el movimiento pendular, tira del muelle. Debido a que en cada oscilación del péndulo el muelle es tensado dos veces, la frecuencia del tensado (doble que la del movimiento pendular) iguala a la frecuencia de las oscilaciones del muelle. Las oscilaciones comienzan a crecer, y el movimiento pendular se empobrece en energía hasta que ésta pasa por completo a las oscilaciones del muelle.

Olsson observó que, a veces, la masa del extremo del muelle se movía en una trayectoria bastante estable, mientras el movimiento pendular pujaba y decaía. Algunas veces, esa trayectoria tenía forma de U; otras, de U invertida. Por fin, en otros casos la trayectoria no estaba bien definida.

H. M. Lai, de la Universidad de Hong Kong, acaba de examinar de nuevo el péndulo de muelle, ampliando y corrigiendo el estudio matemático ya existente. Y ha averiguado que las trayectorias estables son curvas de Lissajous (llamadas así en honor de Jules Antoine Lissajous, físico francés del siglo XIX) que dependen de varios parámetros del montaje y, en especial, de las fases relativas de los movimientos pendular y del muelle.

La trayectoria puede variar de varias maneras conforme el movimiento pendular crece y decrece [*véase la figura 11*]. Quizás iniciase en forma de una U que se deforme hasta una figura en corbata de lazo. Cuando el movimiento pendular se acerca a su máximo, la trayectoria retoma la forma de U. Durante la mengua del movimiento, la trayectoria se deforma en corbata de lazo como antes, pero entonces con el movimiento invertido. La trayectoria sufre unas variaciones similares si la masa sigue inicialmente una trayectoria en forma de U invertida.

Del péndulo de Wilberforce apenas se ha tratado desde la publicación original. Se trata de otro caso de sistema que puede oscilar según modos normales y exhibir pulsaciones cuando no es así. En los modos normales intervienen tanto el movimiento vertical del objeto sujeto al muelle como su rotación en torno a un eje vertical.

El acoplamiento entre los movimientos vertical y de rotación se logra mediante el arrollamiento del muelle. Cuando estiramos un muelle, su extremo gira además. En uno de los modos normales de oscilación el extremo del muelle ejecuta un movimiento de rosca en el mismo sentido que la espiral del muelle. En el otro modo normal el movimiento de rosca tiene el sentido opuesto.

Para que el péndulo actúe de la mejor manera la frecuencia de las oscilaciones rotacionales puras debe igualar a la frecuencia de las oscilaciones del muelle puras. Ello se consigue dotando al objeto suspendido del muelle de unos apéndices horizontales que permitan cambiar la frecuencia de las oscilaciones de giro. A tal fin pueden servir dos pernos, con una tuerca cada uno, que se extiendan simétricamente desde el eje vertical del péndulo. Desplazando las tuercas hacia afuera, disminuye la frecuencia de las oscilaciones rotacionales; desplazándolas hacia adentro, aumenta. Ajustándolas convenientemente pueden igualarse las frecuencias de ambas oscilaciones.

El péndulo puede ponerse en uno de sus modos normales tirando de él hacia abajo a la vez que se gira el extremo el ángulo adecuado. Al soltarlo, oscilará verticalmente y se girará con amplitudes invariables, o sea, sin transferencia de energía alguna entre las oscilaciones vertical y rotacional. Si se tira del péndulo sin girar el extremo, al soltarlo pulsarán los dos modos normales. Entonces, el péndulo oscilará unas veces verticalmente, sin rotación, y otras, girará sin oscilaciones verticales.

Construyendo y estudiando sistemas oscilantes que presenten modos normales o resonancia paramétrica pueden aprenderse muchas cosas. ¿Hay más ejemplos de ambos tipos? Dado que el péndulo de Wilberforce parece haber quedado dormido largos años, quizá valiera la pena analizarlo con bastante mayor detalle.

Libros

Sinopsis de los grandes tipos de organización de la vida y la razón lógica en la ciencia experimental

Ramón Margalef y Luis Alonso

CINCO REINOS. GUIA ILUSTRADA DE LOS PHYLA DE LA VIDA EN LA TIERRA, por Lynn Margulis y Karlene V. Schwart. Editorial Labor, S.A.; Barcelona, 1985. Es la traducción de una obra publicada en 1982 en Estados Unidos y que pretende proporcionar una visión sinóptica de los grandes tipos de organización que se reconocen en el conjunto de los seres vivos. El número total de estos tipos (*phylum, phyla*, dejado así en la traducción) es de 89 y reciben, en principio, un tratamiento uniforme, tanto si contienen un número de especies muy pequeño (placozoos, por ejemplo), como si son muy ricos (artrópodos, cordados, o angispermas o angiospermatófitos, nombre que se atraganta un poco y que en una de las pocas erratas se convierte en angiospermabófitos). La finalidad del libro no es, pues, dar una idea de la diversidad de la naturaleza en lo que se refiere a riqueza de formas, sino más bien seguir las líneas arquitectónicas básicas de la evolución. Precisamente si las autoras se extienden en algunos grupos, esto ocurre en los más raros. El texto, conciso y exacto, con las referencias bibliográficas pertinentes, va acompañado de figuras generalmente muy bien escogidas, aunque algunos de los esquemas exageran ciertos caracteres (algunos detalles en flagelos), sin duda con fines didácticos.

El simbolismo utilizado para representar la distribución ecológica de cada *phylum* y el tamaño de los individuos no me parece muy afortunado, aunque está en la línea de utilizar símbolos ideográficos cada vez más. Por supuesto, la delimitación o la separación de los grupos es, en muchos casos, discutible. Poner a los gamófitos (algas conjugadas) en un *phylum* distinto de los clorófitos (desde *Chlamydomonas* a *Chara*, añadiendo las prasinofíceas), llama, por lo menos, la atención y posiblemente se puede repetir análoga crítica con referencia a otros cortes. La misma división de los seres vivos en cinco reinos: bacterias, protoctistas (los antiguos protistas sin las bacterias), hongos, animales y plantas, perpetúa de otra manera antiguas imprecisiones y delimitaciones confusas. Como indicaba antes, *Chara* está como protoctista y no como planta. Algunas denominaciones, sin duda necesarias, son chocantes, como las bacterias "metanocreadoras". Los líquenes aparecen como el *phylum* Micoficófitos. El texto es seguido de un buen índice y de un glosario. La traducción es correcta, aunque la adherencia al original, tendencia explicable en un libro científico, suena a veces envarada. Creo que este libro puede ser un vademécum muy útil para el estudiante de biología; pero, además, se aprenden muchos hechos importantes y curiosos en su lectura. Con prudente discreción, Margulis no utiliza el libro para difundir sus puntos de vista acerca del origen de la célula eucariótica: en realidad los hechos hablan por sí mismos. (R. M.)

THE ETIOLOGY, CONCEPT, AND PROPHYLAXIS OF CHILDBED FEVER, por Ignaz Semmelweis. Traducción (del alemán) e introducción de K. Codell Carter. The University of Wisconsin Press, 1983. Más o menos todo el mundo tiene una vaga idea de Semmelweis, arquetipo de científico incomprendido que acaba muriendo loco en un asilo. Las otras facetas del personaje se conocen fragmentariamente. Así, patólogos y obstetras saben de su labor en la etiología y descripción de la fiebre puerperal; los historiadores de la medicina recuerdan su atención a la estadística aplicada a la práctica clínica, la introducción del cepillo de uñas, la asepsia y de otras medidas profilácticas, y algunos epistemólogos (Carl G. Hempel, por ejemplo) se recrean en la pureza de su razonamiento deductivo. Por todas esas causas, y alguna más, merece la pena adentrarse en su obra. Y entre esas razones no citadas, la confianza del investigador en la verdad de su teoría: "No he entrado en polémica porque sea beligerante. Ahí están esos cuatro años de silencio para demostrarlo. Ante la oposición con que se han recibido mis opiniones, sin embargo, el lector que no se guíe por prejuicios estará de acuerdo en que se acabó el plazo de silencio y que me asiste el derecho, y hasta tengo obligación, de salir al paso. Cuando desde mi convencimiento actual miro al pasado, sólo resisto las miserias que sufrí si, al propio tiempo, dirijo la mirada hacia delante. Y veo días en que sólo se producirán autoinfecciones en las clínicas maternales del mundo. Comparadas con las mujeres que se salvarán en el futuro, las pacientes que yo y mis discípulos libramos resultan un número insignificante. Y si no se me concede ver ese mañana con mis propios ojos, mi muerte al menos resplandecerá con la seguridad de que, antes o después, ese día inevitablemente llegará" (*Epílogo*).

Se cree a veces que la investigación científica luce más si la adobamos de mediciones sin cuento, si nos aferramos a la observación ruda y primaria. Y se olvida la necesidad del razonamiento lógico, de la deducción rigurosa. Amén de otros factores en que ahora no vamos a detenernos, como la capacidad imaginativa de crear hipótesis, tomar modelos de otras disciplinas o simplemente pensar en una situación diversa. Esa alergia injustificada a las reglas del pensamiento, o a la imaginación, convierte muchas veces el trabajo en mera casuística. Es lastre de la *nuova scienza* que no han soltado muchos científicos. "Non fingendum, aut excogitandum, sed inveniendum quid natura faciat, aut ferat", escribía Bacon: No hay que crear fantasmas o sumirnos en subida especulación, sino descubrir qué es lo que la naturaleza produce o porta, podríamos traducir con cierta libertad. La verdad es que Bacon arremetía contra otra casuística, la baja escolástica, y contra excesos de la fantasía que ya había denunciado en el siglo XVI Andrea Cesalpino en determinados herbarios.

La obra de Ignaz Semmelweis (1818-1865), hito en medicina perinatal, encierra especial atractivo para los culti-

vadores de la teoría de la ciencia. Lo que explica que esta edición abreviada de la Universidad de Wisconsin haya corrido a cargo de un profesor de lógica, conocido ya por otras contribuciones a esa especialidad. Toda teoría es, en definitiva, un sistema coherente de deducciones, que pretende responder, obviamente, al fenómeno o proceso que estemos describiendo o explicando. Las deducciones se rigen por unas normas. Entre las reglas primitivas, es decir, no derivadas, de inferencia está la del *Modus tollens*. ¿En qué consiste? Sea p conclusión de un sistema de enunciados, t, formado por teorías y condiciones iniciales, cuya simbolización lógica se expresa: $t \rightarrow p$; y se lee: p se sigue de t. Supongamos también, o demostremos, que p es falso. Entonces, dadas la relación de deducibilidad $t \rightarrow p$ y la negación de p, inferimos que t es falso a su vez.

En dos ocasiones se hace cargo Semmelweis de la clínica maternal de Viena: del primero de julio al 20 de octubre de 1846 y desde el 20 de marzo de 1847 hasta el mismo mes y día de 1849. En ese intervalo de cuatro años "dudé de las enseñanzas relativas a la fiebre puerperal (que la atribuían sobre todo a 'influencias atmosférico-cósmico-telúricas') y me vi irresistiblemente abocado a mi decisión (la enfermedad debíase a contagio por parte de los alumnos que no se lavaban enérgicamente después de las prácticas de autopsia)"... (p. 61-62). Mostraban las estadísticas, que, de las dos salas del hospital, la primera había registrado una tasa de mortandad del 7,7 en 1841, frente al 3,5 de la segunda sala ese mismo año; en 1842, del 15,8 y 7,5, respectivamente; en 1843, del 8,9 en la primera y 5,9 en la segunda; en 1844, del 8,2 y 2,3, respectivamente; en 1845, del 6,8 y 2,03, respectivamente, y, en 1864, de 11,4 en la primera y de 2,7 en la segunda. Teníase, pues, una media general de 9,92 en la primera sala y de 3,38 en la segunda. ¿Cuál era el motivo de tan palmaria diferencia?

No podía ser la epidemia atmosférica, porque morirían todas en un porcentaje idéntico aproximado. Además, sólo se registraba en el recinto hospitalario. Negando p, por recordar la regla de inferencia, negábase t, la hipótesis o sistema de partida. Tampoco el hacinamiento era responsable, pues ante el pánico que infundía la primera sala, las mujeres se apiñaban en la segunda. Examinó otras hipótesis de partida. "Ni siquiera las prácticas religiosas escaparon a nuestra atención" (p. 71). ¿Debíase el mal a la impresión que sufrían las parturientas ante la presencia del sacerdote revestido para administrar los últimos sacramentos acompañado del sacristán que anunciaba su visita al son de la campanilla? Cambió de ruta el sacerdote y se suprimió el campanilleo: "la tasa de mortandad, empero, persistía inalterada" (p. 73). Cuantas hipótesis se fueron formulando caían desechadas por la comprobación empírica adversa.

Cuando inicia su segunda período en la primera clínica se entera, de vuelta a Viena, de la muerte de Jakob Kolletschka. Era éste profesor de medicina legal y solía realizar las autopsias en compañía de los alumnos. En uno de esos ejercicios un alumno le clavó el escalpelo en un dedo. Kolletschka "contrajo linfangitis y flebitis en la extremidad superior... Murió de pleuresía bilateral, pericarditis, peritonitis y meningitis. Días antes de expirar, se le formó también en un ojo una metástasis... Vi claramente que la enfermedad que acabó con Kolletschka era idéntica a la que provocó la muerte de centenares de mis pacientes..." (p. 87-88). El mal estaba identificado: lo portaban los propios alumnos que no se lavaban bien después de las prácticas de autopsia y lo comunicaban a las infelices mujeres que reconocían. Las estadísticas se encargaron de darle la razón: la tasa bajó drásticamente cuando se lavaron enérgicamente con una solución clorurada.

Pero las tribulaciones de Semmelweis no terminaron ahí... ni el razonamiento lógico tampoco. Si, por haberse comprobado p, creyéramos que se demuestra t, caeríamos en lo que se llama falacia de afirmación de consecuente. La ciencia experimental conoce múltiples ejemplos históricos en que siendo verdad la implicación empírica que contrasta una hipótesis, ésta no siempre es verdadera. Expresado en formalismo lógico: aunque sean ciertos $t \rightarrow p$ y p, no se sigue que lo sea t. El propio Semmelweis, que asignaba la causa de la muerte a "partículas cadavéricas" que habían quedado en las manos de los alumnos que procedían de la sala de autopsias, reconocería más tarde otras causas determinantes de la fiebre puerperal (p. 247). Parece ser que él contrajo la enfermedad de Alzheimer, una suerte de demencia senil, en la que queda mucho por conocer, y que lo mataron las heridas que le infligieron los loqueros del manicomio donde estaba recluido. Un triste remedo de su labor médica. (L. A.)

Bibliografía

Los lectores interesados en una mayor profundización de los temas expuestos pueden consultar los trabajos siguientes:

MOLECULAS DE LA VIDA

PHAGE AND THE ORIGINS OF MOLECULAR BIOLOGY. Dirigido por Gunther Stent, J. Cairns, James D. Watson et al. Cold Spring Harbor Laboratory, 1966.

MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL. Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts y James D. Watson. Garland Publishing, Inc., 1983.

ADN RECOMBINANTE. James D. Watson, John Tooze y David T. Kurtz. Editorial Labor, Barcelona; en prensa.

ADN

ENHANCER ELEMENTS. George Khoury y Peter Gruss en *Cell*, vol. 33, n.° 2, págs. 313-314; junio, 1983.

HIGHER ORDER STRUCTURE OF CHROMATIN: ORIENTATION OF NUCLEOSOMES WITHIN THE 30 NM CHROMATIN SOLENOID IS INDEPENDENDENT OF SPECIES AND SPACER LENGTH. James D. McGhee, Joanne M. Nichol, Gary Felsenfeld y Donad C. Rau en *Cell*, vol. 33, n.° 3, págs. 831-841; julio, 1983.

THE LOCUS OF SEQUENCE-DIRECTED AND PROTEIN-INDUCED DNA BENDING. Hen-Ming Wu y Donald M. Crothers en *Nature*, vol. 308, n.° 5959, págs. 509-513; 5 de abril de 1984.

THE DISTAL TRANSCRIPTION SIGNALS OF THE HERPESVIRUS *TK* GENE SHARE A COMMON HEXANUCLEOTIDE CONTROL SEQUENCE. Steven L. McKnight, Robert C. Kingsbury, Andrew Spence y Michael Smith en *Cell*, vol. 37, n.° 1, págs. 253-262; mayo, 1984.

INTERACTION OF SPECIFIC NUCLEAR FACTORS WITH THE NUCLEASE-HYPERSENSITIVE REGION OF THE CHICKEN ADULT β-GLOBIN GENE: NATURE OF THE BINDING DOMAIN. Beverly M. Emerson, Catherine D. Lewis y Gary Felsenfeld en *Cell*, vol. 41, n.° 1, págs. 21-30; mayo, 1985.

ARN

DO FEATURES OF PRESENT-DAY EUKARYOTIC GENOMES REFLECT ANCIENT SEQUENCES ARRANGEMENTS? James E. Darnell, Jr., en *Evolution Today, Proceedings of the Second International Congress of Systematic and Evolutionary Biology,* dirigido por G. G. E. Scudder y J. L. Reveal, 1981.

VARIETY IN THE LEVEL OF GENE CONTROL IN EUKARYOTIC CELLS. James E. Darnell, Jr., en *Nature*, vol. 297, n.° 5865, págs. 365-371; 3 de junio de 1982.

MADURACIÓN DEL ARN. James E. Darnell, Jr., en *Investigación y Ciencia*, n.° 87, págs. 50-61; diciembre, 1983.

RNA SPLICING: THREE THEMES WITH VARIATIONS. Thomas R. Cech en *Cell*, vol 34, n.° 3, págs. 713-716; octubre, 1983.

SPLICING OF MESSENGER RNA PRECURSOR IS INHIBITED BY ANTISERA TO SMALL NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN. Richard A. Padgett, Stepehn M. Mount, Joan A. Steiz y Phillip A. Sharp en *Cell*, vol 35, n.° 1, págs. 101-107; noviembre, 1983.

PROTEINAS

THE ANATOMY AND TAXONOMY OF PROTEIN STRUCTURE. Jane S. Richardson en *Advances in Protein Chemistry*, vol 34, págs. 167-339; 1981.

SIMILAR AMINO ACID SEQUENCES: CHANCE OR COMMON ANCESTRY? Russell F. Doolittle en *Science*, vol 214, n.° 4517, págs. 149-159; 9 de octubre de 1983.

A SIMPLE METHOD FOR DISPLAYING THE HYDROPATHIC CHARACTER OF A PROTEIN. Jack Kyte y Russell F. Doolittle en *Journal of Molecular Biology*, vol 157, n.° 1, págs. 105-132; 5 de mayo de 1983.

PRINCIPLES THAT DETERMINE THE STRUCTURE OF PROTEINS. Cyrus Chothia en *Annual Review of Biochemistry*, vol. 53, págs. 537-572; 1984.

A UNIFYING CONCEPT FOR THE AMINO ACID CODE. Rosemarie Swanson en *Bulletin of Mathematical Biology*, vol 42, n.° 2, págs. 187-203; 1984.

MOLECULAS DE LA MEMBRANA CELULAR

MAMMALIAN PLASMA MEMBRANES. Mark S. Bretscher y Martin C. Raff en *Nature*, vol. 258, n.° 5530, págs. 43-49; 6 de noviembre de 1975.

MEMBRANE ASYMMETRY. James E. Rothman y John Leonard en *Science*, vol. 195, n.° 4280, págs. 743-753; 25 de febrero de 1977.

COATED PITS, COATED VESICLES, AND RECEPTOR-MEDIATED ENDOCYTOSIS. Joseph L. Goldstein, Richard G. W. Anderson y Michael S. Brown en *Nature*, vol. 279, n.° 5715, págs. 679-685; 21 de junio de 1979.

MEMBRANE RECYCLING BY COATED VESICLES. Barbara M. F. Pearse y Mark S. Bretscher en *Annual Review of Biochemistry*, vol. 50; 1981.

MOLECULAS DE LA MATRIZ CELULAR

INTERACTION OF CYTOSKELETAL PROTEINS ON THE HUMAN ERYTHROCYTE MEMBRANE. D. Branton, C. M. Cohen y J. Tyler en *Cell*, vol. 24, n.° 1, págs. 24-32; abril, 1981.

ORGANIZATION OF THE CYTOPLASM. *Cold Spring Harbor Laboratory Symposia on Quantitative Biology,* vol. 46; 1982.

TUMOR DIAGNOSIS BY INTERMEDIATE FILAMENT TYPING: A NOVEL TOOL FOR SURGICAL PATHOLOGY. Mary Osborn y Klaus Weber en *Laboratory Investigation*, vol. 48, n.° 4, págs. 372-394; abril, 1983.

A GUIDED TOUR OF THE LINVING CELL Christian de Duve. Scientific American Books, Inc., 1984.

MOVEMENT OF MYOSIN COATED BEADS ON ORIENTED FILAMENTS RECONSTITUTED FROM PURIFIED ACTIN. J. A. Spudich, S. J. Kron y M. P. Sheetz en *Nature*, vol. 315, n.° 6020, págs. 584-586; 13 de junio de 1985.

MOLECULAS DEL SISTEMA INMUNITARIO

EVIDENCE FOR SOMATIC REARRANGEMENT ON IMMUNOGLOBULIN GENES CODING FOR VARIABLE AND CONSTANT REGIONS. Nobumichi Hozumi y Susumu Tonegawa en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 73; n.° 10, págs. 3628-3632; 1976.

SOMATIC GENERATION OF ANTIBODY DIVERSITY. Susumu Tonegawa en *Nature*, vol. 302; n.° 5909, págs. 575-581; 14 de abril de 1983.

SEQUENCE RELATIONSHIPS BETWEEN PUTATIVE T-CELL RECEPTOR POLYPEPTIDES AND IMMUNOGLOBULINS. Stephen M. Hedrick, Ellen A. Nielsen, Joshua Kavaler, David I. Cohen y Mark M. Davis en *Nature*, vol. 308, n.° 5955, págs. 153-158; 8 de marzo de 1984.

A THIRD REARRANGED AND EXPRESSED GENE IN A CLONE OF CYTOTOXIC T LYMPHOCYTES. H. Saito, D. M. Kranz, Y. Takagaki, A. C. Hayday, H. N. Eisen y S. Tonegawa en *Nature*, vol. 312, n.º 5989, págs. 36-40; noviembre, 1984.

BASE MOLECULAR DE LA COMUNICACION INTERCELULAR

DYNAMICS OF STEROID HORMONE RECEPTOR ACTION. Benita Katzenellenbogen en *Annual Review of Physiology*, vol. 42, págs. 17-35; 1980.

BRAIN PEPTIDES: WHAT, WHERE, AND WHY? Dorothy T. Krieger en *Science*, vol. 222, n.º 4627, págs. 975-985; 2 de diciembre de 1983.

STRUCTURE OF MAMMALIAN STEROID RECEPTORS: EVOLVING CONCEPTS AND METHODOLOGICAL DEVELOPMENT. Merry R. Sherman y John Stevens en *Annual Review of Physiology*, vol. 46, págs. 83-105; 1984.

DRUG AND NEUROTRANSMITTER RECEPTORS IN THE BRAIN. Solomon H. Snyder en *Science*, vol. 224, n.º 4644, págs. 22-31; 6 de abril de 1984.

THE NATURE AND REGULATION OF THE INSULIN RECEPTOR: STRUCTURE AND FUNCTION. Michael P. Czech en *Annual Review of Physiology*, vol. 47, págs. 357-381; 1985.

BASE MOLECULAR DE LA COMUNICACION INTRACELULAR

CELLULAR ONCOGENES AND RETROVIRUSES. J. Michael Bishop en *Annual Review of Biochemistry*, vol. 52, págs. 301-354; 1983.

G PROTEINS AND DUAL CONTROL OF ADENYLATE CYCLASE. Alfred G. Gilman en *Cell*, vol. 36, n.º 3, págs. 577-579; marzo, 1984.

THE ROLE OF PROTEIN KINASE C IN CELL SURFACE SIGNAL TRANSDUCTION AND TUMOR PROMOTION. Yasutomi Nishizuka en *Nature*, vol. 308, n.º 5961, págs. 693-698; 19 de abril de 1984.

INOSITOL TRIPHOSPHATE, A NOVEL SECOND MESSENGER IN CELLULAR SIGNAL TRANSDUCTION. M. J. Berridge y R. F. Irvine en *Nature*, vol. 312, n.º 5992, págs. 315-321; 22 de noviembre de 1984.

BASE MOLECULAR DEL DESARROLLO

CLONING OF AN *X. LAEVIS* GENE EXPRESSED DURING EARLY EMBRYOGENESIS CODING FOR A PEPTIDE REGION HOMOLOGOUS TO DROSOPHILA HOMEOTIC GENES. Andrés E. Carrasco, William McGinnis, Walter J. Gehring y Eddy M. De Robertis en *Cell*, vol. 37, n.º 2, págs. 409-414; junio, 1984.

A HOMOLOGOUS PROTEIN-CODING SEQUENCE IN DROSOPHILA HOMEOTIC GENES AND ITS CONSERVATION IN OTHER METAZOANS. William McGinnis, Richard L. Garber, Johannes Wirz, Atsushi Kuroiwa y Walter J. Gehring en *Cell*, vol. 37, n.º 2, págs. 403-408; junio, 1984.

FLY AND FROG HOMOEO DOMAINS SHOW HOMOLOGIES WITH YEAST MATING TYPE REGULATORY PROTEINS. John C. W. Shepherd, William Mcginnis, Andrés E. Carrasco, Eddy M. De Robertis y Walter J. Gehring en *Nature*, vol. 310, n.º 5972, págs. 70-71; 5 de julio de 1984.

ISOLATION OF A HOMOEO BOX-CONTAINING GENE FROM THE *ENGRAILED* REGION OF *DROSOPHILA* AND THE SPATIAL DISTRIBUTION OF ITS TRANSCRIPTS. Anders Fjose, William J. McGinnis y Walter J. Gehring en *Nature*, vol. 313, n.º 6000, págs. 284-289; 24 de enero de 1985.

BASE MOLECULAR DE LA EVOLUCION

TEORÍA NEUTRALISTA DE LA EVOLUCIÓN MOLECULAR. Motoo Kimura en *Investigación y Ciencia*, vol. 241, n.º 40, págs. 46-55; enero, 1980.

BIRDS, BEHAVIOR, AND ANATOMICAL EVOLUTION. Jeff S. Wyles, Joseph G. Kunkel y Allan C. Wilson en *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 80, n.º 14, págs. 4394-4397; julio, 1983.

STOMACH LYSOZYMES OF RUMINANTS, I: DISTRIBUTION AND CATALYTIC PROPERTIES. Deborah E. Dobson, Ellen M. Prager y Allan C. Wilson en *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 259, n.º 18, págs. 11607-11616; 25 de septiembre de 1984.

TALLER Y LABORATORIO

VIBRATIONS AND WAVES. A. P. French. W. W. Norton & Co., Inc., 1971.

TEACHING PHYSICS WITH COUPLED PENDULUMS. Joseph Priest y James Poth en *The Physics Teacher*, vol. 19, n.º 2, págs. 80-85; febrero, 1982.

ON THE RECURRENCE PHENOMENON OF A RESONANT SPRING PENDULUM. H. M. Lai en *American Journal of Physics*, vol. 52, n.º 3, págs. 219-223; 1984.

Indice anual

Este índice contiene los nombres de los autores y artículos aparecidos en Investigación y Ciencia *a partir de enero de 1985. Se incorpora asimismo la relación alfabética de las secciones* Juegos de ordenador *y* Taller y laboratorio.

AUTORES

TITULOS

TALLER Y LABORATORIO

Autor: Jearl Walker

JUEGOS DE ORDENADOR

Autor: A. K. Dewdney